

mgr Paulina Strzyga-Łach

**Badanie mechanizmów aktywności cytotoksycznej
pochodnych tiomocznika**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w
dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. n. farm. Anna Bielenica

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Alicja Chrzanowska

Katedra i Zakład Biochemii

Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2025 r.

Słowa kluczowe: pochodne tiomocznika, działanie przeciwnowotworowe, działanie cytotoksyczne, apoptoza, interleukina-6; błękit trypanu, kaspazy 3/7, cykl komórkowy, profil metabolomiczny, hodowla 3D

Key words: thiourea derivatives, anticancer activity, cytotoxic effects, apoptosis, interleukin-6; trypan blue, caspases 3/7, cell cycle, metabolomic profile, 3D culture

Część badań wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wykonano w ramach projektu Młodego Badacza o numerze 1WK/3/M/MB/N/22, realizowanego w latach 2022-2023, finansowanego ze środków subwencji przeznaczonej na naukę, uzyskanej przez Warszawski Uniwersytet Medyczny.

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania **dr hab. n. farm. Annie Bielenicy** oraz **dr hab. n. med. Alicji Chrzanowskiej** za nieocenione wsparcie merytoryczne i ogromne zaangażowanie, bez których powstanie niniejszej pracy nie byłoby możliwe.

Słowa wdzięczności kieruję również do pracowników Katedry i Zakładu Biochemii, od których miałam przyjemność uczyć się każdego dnia.

Dziękuję wszystkim osobom, które wniosły choćby najmniejszy wkład w powstanie tej rozprawy – każdy gest wsparcia i każda dobra rada były dla mnie istotne i budujące.

Z całego serca dziękuję moim Rodzicom – za stworzenie mi możliwości kształcenia.

Najgłębsze podziękowania kieruję do moich najbliższych – **Męża i Syna** – za obecność, zrozumienie i siłę, którą dawali mi w chwilach zwątpienia. To dzięki Wam udało mi się doprowadzić tę drogę do końca.

Spis treści

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską.....	6
Publikacje naukowe niebędące częścią rozprawy doktorskiej	7
Udział w konferencjach	8
Zrealizowane projekty badawcze.....	8
Nagrody i wyróżnienia.....	8
Wykaz zastosowanych skrótów	9
Streszczenie w języku polskim	12
Streszczenie w języku angielskim	14
Wstęp	16
Założenia i cel pracy	21
Kopie opublikowanych prac	40
Podsumowanie i wnioski	83
Piśmiennictwo.....	85
Oświadczenia współautorów	91

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

„Badanie mechanizmów aktywności cytotoksycznej pochodnych tiomocznika”

Publikacja 1 (P1)

Strzyga-Łach P, Chrzanowska A, Podsadni K, Bielenica A. Investigation of the mechanisms of cytotoxic activity of 1,3-Disubstituted thiourea derivatives. Pharmaceuticals. 2021, 28; 14(11).

IF – 5,215, MNiSW – 100, Q1

Publikacja 2 (P2)

Strzyga-Łach P, Kurpios-Piec D, Chrzanowska A, Szczepaniak J, Bielenica A. 1,3-Disubstituted thiourea derivatives: Promising candidates for medicinal applications with enhanced cytotoxic effects on cancer cells. Eur J Pharmacol. 2024, 14;982:176885.

IF – 4,200, MNiSW – 100, Q1

Publikacja 3 (P3)

Strzyga-Łach P, Chrzanowska A, Kiernozek-Kalińska E, Żyżyńska-Granica B, Podsadni K, Podsadni P, Bielenica A. Proapoptotic effects of halogenated bis-phenylthiourea derivatives in cancer cells. Arch Pharm. 2023, 356(9).

IF – 4,300, MNiSW – 70, Q1

Łączny IF publikacji stanowiących rozprawę doktorską – 13,715

Łączna liczba punktów MNiSW - 270

Publikacje naukowe niebędące częścią rozprawy doktorskiej

1. Martula E, Morak-Młodawska B, Jeleń M, **Strzyga-Łach P**, Struga M, Żurawska K, Kasprzycka A, Bagrowska W. Comparative Analysis of Structural Analogs of Dipyrithiothiazines with m-Xylene and a Lutidine Moiety - In Silico, In Vitro, and Docking Studies. *Applied Sciences*. 2024; 14(16):7263. IF – 2,500, MNiSW – 100.
2. Dziduch K, Janowska S, Andrzejczuk S, **Strzyga-Łach P**, Struga M, Feldo M, Demchuk O, Wujec M. Synthesis and Biological Evaluation of New Compounds with Nitroimidazole Moiety. *Molecules*. 2024, 26;29(13):3023. IF – 4,200, MNiSW – 40.
3. Janowska S, Khylyuk D, Janowski M, Kosikowska U, **Strzyga-Łach P**, Struga M, Wujec M. Synthesis and Biological Evaluation of New Schiff Bases Derived from 4-Amino-5-(3-fluorophenyl)-1,2,4-triazole-3-thione. *Molecules*. 2023, 17;28(6):2718. IF – 4,200, MNiSW – 140.
4. Kubiak-Tomaszewska G, Roszkowski P, Grosicka-Maciąg E, **Strzyga-Łach P**, Struga M. Effect of Hydroxyl Groups Esterification with Fatty Acids on the Cytotoxicity and Antioxidant Activity of Flavones. *Molecules*. 2022, 10;27(2):420. IF – 4,600, MNiSW – 140.
5. Bielenica A, Sanna G, Madeddu S, Giliberti G, Stefańska J, Kozioł AE, Savchenko O, **Strzyga-Łach P**, Chrzanowska A, Kubiak-Tomaszewska G, Struga M. Disubstituted 4-Chloro-3-nitrophenylthiourea Derivatives: Antimicrobial and Cytotoxic Studies. *Molecules*. 2018, 21;23(10):2428. IF – 3,060, MNiSW – 30.
6. **Strzyga-Łach P**, Czeczot H. Rola flawonoidów w modulacji stanu zapalnego [The role of flavonoids in the modulation of inflammation]. *Pol Merkur Lekarski*. 2016, 40(236):134-40. Polish. MNiSW – 5.
7. **Strzyga P**, Czeczot H. Nowe spojrzenie na ceruloplazminę. *Farmacja Polska*, 2015, tom 71, nr 10, str.: 609-614. MNiSW – 8.
8. Czeczot H, **Strzyga P**, Skrzycki M. Miedź w zdrowiu i chorobie. *Farmacja Polska*, 2015, tom 71, nr 9, str.: 586-592. MNiSW – 8.
9. Kowalczyk P, Chalimoniuk K, Danielak A, Dziedziela D, Wilczyńska P, Kowalska M, Laskowska J, Rachocka M, Szczepaniak J, Walter T, **Strzyga P**,

Szymańska J, Słomka M, Zawadka K, Staszewska M. Terapia fagowa – nadzieje i obawy. Nowa Medycyna, 2013. 1233-599. MNiSW – 4.

Sumaryczny Impact Factor wszystkich publikacji wg listy Journal Citation Reports JCR zgodnie z rokiem opublikowania: **32,275**

Sumaryczna punktacja MEiN (dawniej MNiSW) wszystkich publikacji: **845**

Liczba cytowań (wg bazy Web of Science) z dnia 02.06.2025: **46**

Indeks Hirscha (wg bazy Web of Science) z dnia 02.06.2025: **4**

Udział w konferencjach

XI Konwersatorium Chemii Medycznej w Lublinie. Prezentacja posterowa: **Paulina Strzyga-Łach**, Dagmara Kurpios-Piec, Alicja Chrzanowska, Marta Struga, Anna Bielenica. 1,3-Disubstituted Thiourea Derivatives: Promising Candidates for Medicinal Applications with Enhanced Cytotoxic Effects on Cancer Cells – 2023.

X Konwersatorium Chemii Medycznej w Lublinie. Prezentacja posterowa: **Paulina Strzyga-Łach**, Anna Bielenica, Marta Struga. Investigation of the mechanisms of cytotoxic activity of 1,3-disubstituted thiourea derivatives – 2021.

Zrealizowane projekty badawcze

Kierownik projektu Młodego Badacza (nr 1WK/3/M/MB/N/22). Badania mechanizmów aktywności cytotoksycznej 1,3-dwupodstawionych pochodnych tiomocznika – 2022 – 2023.

Nagrody i wyróżnienia

Nagroda zespołowa Jego Magnificencji Rektora – prof. dr hab. n. med. Zbigniewa Gacionga, za osiągnięcia naukowe w temacie „Badania mechanizmów aktywności cytotoksycznej 1,3-dwupodstawionych pochodnych tiomocznika” – 2022.

Wykaz zastosowanych skrótów

5-HETE - ang. *5-hydroxyeicosatetraenoic acid*, kwas 5-hidroksyeikozatetraenowy

AA - ang. *arachidonic acid*, kwas arachidonowy

AbI - kinaza AbI

AMPK - ang. *5'AMP-activated protein kinase*, kinaza aktywowana 5'AMP

CEPT WUM - Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii Warszawskiego
Uniwersytetu Warszawskiego

CRC - ang. *colorectal cancer*, rak jelita grubego

DHR-123 - ang. *dihydrorhodamine 123*, dihydrorodamina 123

DMSO - ang. *dimethyl sulfoxide*, dimetylosulfotlenek

DNA - ang. *deoxyribonucleic acid*, kwas deoksyrybonukleinowy

ELISA - ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*, test immunoenzymatyczny

FI - ang. *fluorescence intensity*, intensywność fluorescencji

FITC - ang. *fluorescein isothiocyanate*, izotiocyanian fluoresceiny

FLT3 - ang. *fms-like tyrosine kinase 3*, kinaza tyrozynowa typu Fms 3

H₂O₂ - nadtlenuk wodoru

HaCaT - zdrowe unieśmiertelnione keratynocyty

HRMS - ang. *high-resolution mass spectrometry*, spektrometria mas wysokiej
rozdzielczości

IC₅₀ - ang. *half maximal inhibitory concentration*, półmaksymalne stężenie hamujące

IL-6 - ang. *interleukin 6*, interleukina 6

K-562 - przewlekła białaczka szpikowa

KEEG - ang. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, Encyklopedia genów i
genomów z Kioto

KIT - ang. *v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*, homolog wirusowego onkogenu mięsaka Hardy-Zuckerman 4

MAPK - ang. *mitogen-activated protein kinase*, kinaza białkowa aktywowana mitogenem

MK-2 - ang. *mitogen kinase*, kinaza mitogenowa 2

MMP - ang. *mitochondrial membrane potential*, potencjał błony mitochondrialnej

MTT - ang. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*, bromek 3-(4, 5-dimetylotiazolyl-2)-2, 5-difenylotetrazoliowy

NFκB - ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, jądrowy czynnik transkrypcyjny

NMR - ang. *nuclear magnetic resonance*, rezonans magnetyczny jądrowy

NO - ang. *nitric oxide*, tlenek azotu

PC3 - przerzutowe komórki raka prostaty

PDGFR-β - ang. *platelet-derived growth factor feceptor β*, receptor β dla płytkopochodnego czynnika wzrostu

PG - ang. *prostaglandin*, prostaglandyna

PGD2 - ang. *prostaglandin 2*, prostaglandyna 2

PI - ang. *propidium iodide*, jodek propidyny

PPARγ - ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* - receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów gamma

RET - ang. *rearranged during transfection*, protoonkogen RET

RET/PTC - *RET proto-oncogene / papillary thyroid carcinoma*, hybrydowy onkogen RET/PTC (RET w raku brodawkowym tarczycy)

ROS, RTF - ang. *reactive oxygen species*, reaktywne formy tlenu

S1P - ang. *sphingosine-1-phosphate*, sfingozyno-1-fosforan

SGGW - Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

SI - ang. *selectivity index*, wskaźnik selektywności

SIRT1 - ang. *sirtuin 1*, sirtuina 1

SIRT2 - ang. *sirtuin 2*, sirtuina 2

STAT-1 - ang. *signal transducer and activator of transcription 1*, przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 1

SW480 - ludzki gruczolakorak okrężnicy

SW620 - ludzki przerzutowy gruczolakorak okrężnicy

TB - ang. *trypan blue*, błękit trypanowy

TILs - ang. *tumor-infiltrating lymphocytes*, limfocyty naciekające guz

TNF- α - ang. *tumor necrosis factor α* , czynnik martwicy nowotworów

UW - Uniwersytet Warszawski

VEGF - ang. *vascular endothelial growth factor*, wzrostowy czynnik śródbłónka naczyniowego

VEGFR - ang. *vascular endothelial growth factor receptor*, receptor dla naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu

WHO - ang. *World Health Organisation*, Światowa Organizacja Zdrowia

Streszczenie w języku polskim

Komórki nowotworowe stanowią paradoksalną, wypaczoną kopię komórek prawidłowych. Wykorzystują mechanizmy, które są fundamentem ludzkiego życia i przetrwania, dlatego leczenie nowotworów pozostaje jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny. Wśród licznych strategii terapeutycznych, chemioterapia wciąż odgrywa kluczową rolę, mimo ograniczeń związanych z niską selektywnością, opornością lekową i zmienną biodostępnością. W niniejszym badaniu skoncentrowano się na ocenie potencjału przeciwnowotworowego zróżnicowanych strukturalnie 1,3-dwupodstawionych pochodnych tiomocznika, zawierających elektroujemne podstawniki w końcowych pierścieniach fenylowych. W celu oceny wpływu modyfikacji strukturalnych na cytotoksyczność, biodostępność oraz selektywność związków, otrzymane pochodne tiomocznika poddano przesiewowym testom cytotoksyczności *in vitro* wobec komórek pierwotnego i przerzutowego raka jelita grubego (SW480 i SW620), prostaty (PC3) oraz białaczki (K-562). Analiza zależności struktura–aktywność pozwoliła na wyselekcjonowanie najbardziej obiecujących związków, które następnie poddano szczegółowym badaniom oceniającym mechanizmy działania. Pochodne 3-(trifluorometylo)fenylotiomocznika **1**, **2**, **3**, **8** i **9** wykazały silne działanie cytotoksyczne oraz wysoką selektywność wobec komórek raka jelita grubego, zarówno pierwotnego, jak i przerzutowego. Jednocześnie analogi te wykazywały silne działanie proapoptotyczne i hamujące wydzielanie IL-6 związanej z progresją nowotworu. Na podstawie aktywności biologicznej wyselekcjonowano dwa związki — dichlorowcopochodną **2** i pochodną 4-trifluorometylową **8**, które cechowały się najniższym stężeniem IC₅₀ i najwyższym wskaźnikiem selektywności (SI). W toku dalszych badań ścieżek metabolicznych wykazano, że obie pochodne aktywowały kaspazy 3/7, a także wpływały na zahamowanie szlaku NF-κB, co wiązało się z obniżeniem poziomu VEGF i potencjalnym działaniem antyangiogennym. Dodatkowo potwierdzono istotne działanie prooksydacyjne obu związków. Z kolei analiza metabolomiczna potwierdziła szczególnie korzystne zmiany w profilu metabolicznym w komórkach przerzutowego raka jelita grubego SW620 oraz, w przypadku pochodnej **2**, także w komórkach raka prostaty. Co ciekawe, związki te wykazały również silną bioaktywność w sferoidach w warunkach hodowli 3D, co może sugerować ich korzystną biodostępność. Z kolei związki **1a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4a**, **5d** i **5j** z drugiej puli badanych halogenopochodnych bisfenylotiomocznika wykazywały silne działanie cytotoksyczne

($IC_{50} < 10,7 \mu M$), porównywalne do cisplatyny. Spośród nich, pochodne **3b** i **5j** wykazały selektywną aktywność wobec komórek nowotworowych linii SW480, a związek **5d** – wobec komórek PC3, jednocześnie pozostając nietoksyczne dla komórek prawidłowych. Wszystkie badane związki hamowały wydzielanie IL-6 w komórkach raka jelita grubego (SW480, SW620) oraz raka prostaty (PC3), a także zwiększały poziom wolnych rodników, co – przy jednoczesnym osłabieniu mechanizmów antyoksydacyjnych – mogło potęgować ich efekt cytotoksyczny. Zaobserwowano również zmiany w cyklu komórkowym – związki **1a**, **3a** i **5d** zwiększały odsetek komórek w fazie sub-G1, związek **3a** – w G0/G1, natomiast **2b** – w G2/M, co może sugerować kolejno indukcję apoptozy lub nekrozy, uniemożliwienie podziału lub uszkodzenie DNA. Największy potencjał przeciwnowotworowy wykazały pochodna dichlorofenylowa **3a** oraz monopodstawione pochodne **1a** i **5j**. Na podstawie przeprowadzonych testów cytotoxycności *in vitro* zaobserwowano obiecujące efekty działania wybranych pochodnych tiomocznika, co wskazuje na ich potencjał jako kandydatów do dalszych badań przedklinicznych w kontekście terapii nowotworów, zarówno litych jak i hematologicznych.

Streszczenie w języku angielskim

Investigation of the mechanisms of cytotoxic activity of thiourea derivatives

Cancer cells are a paradoxical, distorted copy of normal cells, exploiting mechanisms that are fundamental to human life and survival. Therefore, cancer treatment remains one of the greatest challenges of modern medicine. Among the numerous therapeutic strategies, chemotherapy still plays a key role, despite the limitations of low selectivity, drug resistance and variable bioavailability. The present study focuses on evaluating the antitumour potential of structurally diverse groups of 1,3-disubstituted thiourea derivatives containing electro-negative substituents in the terminal phenyl rings. Such modifications may affect the cytotoxicity, bioavailability and selectivity of the compounds. The resulting thiourea derivatives were subjected to *in vitro* cytotoxic screening tests against primary and metastatic colon (SW 480 and SW 620), prostate (PC3) and leukaemia (K-562) cancer cells. Structure-activity relationship analysis allowed the selection of the most promising compounds, which were then subjected to detailed studies assessing the mechanisms of action. From the group of 3-(trifluoromethyl)phenylthioureas, particularly derivatives **1**, **2**, **3**, **8** and **9** showed strong cytotoxic activity and high selectivity against colorectal cancer cells, both primary and metastatic. At the same time, these analogues showed strong pro-apoptotic effects and inhibition of IL-6 secretion associated with tumor progression. On the basis of biological activity, two compounds - dihalogen derivative **2** and 4-trifluoromethylthiourea **8** - were selected, which had the lowest IC₅₀ and the highest selectivity index (SI). Further studies of metabolic pathways showed that both derivatives activated caspase 3/7 and also affected the inhibition of the NF-κB pathway, which was associated with a reduction in VEGF levels and a potential anti-angiogenic effect. In addition, significant pro-oxidant effects of both compounds were confirmed. Metabolomic analysis, on the other hand, confirmed particularly beneficial changes in the metabolic profile in SW620 metastatic colorectal cancer cells and, in the case of derivative **2**, also in prostate cancer cells. Interestingly, these compounds also showed strong bioactivity in spheroids under 3D culture conditions, which may suggest their favourable bioavailability. Meanwhile, compounds **1a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4a**, **5d** and **5j** from the second pool of halogenated bisphenylthiourea derivatives tested showed strong cytotoxic effects (IC₅₀ < 10.7 μM), comparable to cisplatin. Of these, derivatives **3b** and **5j** showed selective activity against cancer cells of the SW480 lineage, and compound **5d** against PC3 cells, while remaining

non-toxic to normal cells. All compounds tested inhibited IL-6 secretion in colorectal cancer (SW480, SW620) and prostate cancer (PC3) cells, and increased free radical levels, what together with impairing antioxidant mechanisms, may have potentiated their cytotoxic effect. Changes in the cell cycle were also observed, with compounds **1a**, **3a** and **5d** increasing the percentage of cells in the sub-G1 phase, compound **3a** in G0/G1 and **2b** in G2/M, which may suggest successively induction of apoptosis or necrosis, prevention of division or DNA damage. The dichlorophenyl derivative **3a** and the monosubstituted thioureas **1a** and **5j** showed the greatest anticancer potential. Promising effects of selected thiourea derivatives were observed from *in vitro* cytotoxicity tests, indicating their potential as candidates for further preclinical studies in the context of both solid and hematological cancer therapy.

Wstęp

"Komórka nowotworowa stanowi zdumiewającą, przewrotną kopię normalnej komórki. Rak jest fenomenalnie skutecznym najeźdźcą i kolonizatorem między innymi dlatego, że wykorzystuje te cechy, dzięki którym my, ludzie, jesteśmy skuteczni – czy to jako gatunek, czy jako poszczególne organizmy [1]".

Cytat ten doskonale pokazuje to, że nowotwory są nierozdzielnie związane z ludzką egzystencją, wykorzystując mechanizmy, które są fundamentalne dla naszego życia i przetrwania. Dlatego ich leczenie pozostaje jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny. Na przestrzeni lat opracowano i przetestowano różne onkologiczne strategie terapeutyczne, wśród których chemoterapia pozostaje jedną z kluczowych metod, i polega na stosowaniu leków mających na celu niszczenie komórek nowotworowych lub hamowanie ich wzrostu. Jednak mimo dynamicznego rozwoju chemoterapii i farmakologii, terapia nowotworów wciąż nie przynosi optymalnych wyników leczenia ze względu na ich heterogenność oraz szybko rozwijające się mechanizmy oporności, a także problemy związane z biodostępnością i selektywnością leków [2, 3]. Celowe jest więc poszukiwanie nowych leków, które umożliwiają eliminację komórek nowotworowych w sposób selektywny, bez uszkodzania zdrowych tkanek. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) najczęściej występującym nowotworem jest rak płuc, a na kolejnych miejscach znajdują się rak prostaty i jelita grubego oraz rak piersi u kobiet [4]. Poza guzami litymi dużym wyzwaniem terapeutycznym są nowotwory układowe takie jak białaczki, gdzie niemożliwość usunięcia chirurgicznego stawia chemoterapię i immunoterapię na pierwszym miejscu wśród podstawowych metody leczenia.

Spośród puli związków, które potencjalnie mogą wykazywać aktywność przeciwnowotworową, dużym zainteresowaniem cieszy się grupa pochodnych tiomocznikowych. Potencjał tych substancji w kontekście terapii przeciwnowotworowej wynika z ich zdolności do działania między innymi jako ligandów koordynacyjnych dla metali, jak również modyfikatorów białek oraz związków o właściwościach utleniająco-redukujących [5, 6]. Ta zdolność do tworzenia kompleksów z jonami metali może prowadzić do powstania nowych związków o właściwościach przeciwnowotworowych. Metale przejściowe, takie jak platyna, miedź, cynk czy nikiel, często odgrywają kluczową rolę w procesach biochemicznych komórek nowotworowych, a utworzone kompleksy

metaloorganiczne zawierające układ tiomocznika mogą wpływać na struktury DNA, hamować replikację komórek nowotworowych, a także blokować szlaki sygnalizacyjne, które są niezbędne do wzrostu i przeżycia komórek rakowych [7, 8].

Pochodne tiomocznika mogą również działać jako modyfikatory białek np. poprzez zmiany ich struktury, aktywności enzymatycznej, a także stabilności, wpływając tym samym na procesy takie jak cykl komórkowy, apoptoza czy odpowiedź na stres oksydacyjny [8, 9]. Indukując stres oksydacyjny, a w rezultacie uszkodzenie DNA i białek, przyspieszają proces eliminacji komórek nowotworowych [10]. Działanie przeciwnowotworowe tiomoczników obejmuje także indukcję apoptozy, czyli programowanej śmierci komórek. Apoptoza jest naturalnym procesem, który pozwala organizmowi eliminować uszkodzone lub nieprawidłowe komórki. Związki z ugrupowaniem tiomocznikowym mogą aktywować szlaki apoptotyczne poprzez wpływ na białka regulujące ten proces, takie jak kaspazy, lub indukować zmiany w funkcji mitochondriów [11]. Dodatkowo, hamują one angiogenezę, czyli proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych, który jest niezbędny do wzrostu i rozprzestrzeniania się guzów nowotworowych [12]. Innym istotnym mechanizmem jest działanie poprzez czynnik martwicy nowotworów (TNF- α), który odgrywa kluczową rolę w regulacji odpowiedzi zapalnej i który również może aktywować szereg szlaków sygnalizacyjnych prowadzących do śmierci komórki [13]. Działanie przeciwnowotworowe obejmuje także zatrzymanie odpowiednich faz cyklu komórkowego oraz modulację odpowiedzi immunologicznej organizmu. Mechanizmy te mogą działać synergistycznie, prowadząc do zahamowania wzrostu guza i zwiększenia skuteczności terapii przeciwnowotworowej [14-16]. Co ciekawe, modyfikacja struktury tiomocznika przez wprowadzenie różnych podstawników przyniosła obiecujące wyniki w postaci zwiększenia aktywności cytotoksycznej. Wzbogacano szkielet tiomocznika o dodatkowe grupy alkilowe, aryłowe, heterocykliczne, a także różne inne grupy funkcyjne, które miały wpływ na właściwości fizykochemiczne i biologiczne cząsteczki, takie jak lipofilowość, polarność oraz zdolność do penetracji błon komórkowych, co mogło zapewnić uzyskanym pochodnym nowe lub zmienione działanie cytotoksyczne, przeciwbakteryjne czy też przeciwwirusowe. Najskuteczniejsze okazały się pochodne, w których terminalne pierścienie fenyłowe zawierały podstawniki elektroujemne [17, 18]. Wprowadzenie grupy elektronoakceptorowej (np. atomu chlorowca) w strategiczną część cząsteczki wyraźnie wpłynęło na jej aktywność biologiczną, powodując zwiększenie lipofilowości, a co za

tym idzie - szybkości absorpcji i transportu substancji *in vivo*. Obecność silnie elektroujemnego podstawnika zmienia również właściwości sąsiednich grup funkcyjnych, co może mieć wpływ na reaktywność, stabilność metaboliczną i charakter chemiczny cząsteczki. Wysoka stabilność z kolei zwiększa biodostępność związku, co przekłada się na jego korzystne parametry farmakokinetyczne. Grupy te, dzięki swojej zdolności do przyciągania elektronów, mogą stabilizować określone formy cząsteczek lub zwiększać ich zdolność do interakcji z biomolekułami w komórkach nowotworowych. W praktyce oznaczało to, że te modyfikacje strukturalne mogły zwiększać skuteczność pochodnych mocznika i tiomocznika w hamowaniu wzrostu komórek nowotworowych, poprawiając jednocześnie ich selektywność i zmniejszając ryzyko toksyczności wobec zdrowych komórek [19, 20]. Różnorodność strukturalna pochodnych tiomocznika umożliwia zatem opracowanie szerokiej gamy związków o zróżnicowanych właściwościach. Dzięki temu możliwa jest optymalizacja ich struktury pod kątem dostosowania do konkretnych typów nowotworów lub systemów dostarczania leków [21]. Wykazano, że pochodne diarylotiomocznikowe zatrzymywały cykl komórkowy w fazie S oraz aktywowały kaspazy-3 poprzez wewnętrzną ścieżkę apoptozy. Z kolei klasa ditiokarbaminianów działała cytotoksycznie wobec różnych rodzajów nowotworów poprzez indukcję stresu oksydacyjnego i hamowanie funkcji proteasomu [21, 22]. Seria pochodnych 4-tiazolidinono-feniloaminopirymidyny, zawierających podstawniki *orto*-Cl oraz *para*-CF₃, wykazała skuteczność w działaniu przeciwnowotworowym wobec komórek przewlekłej białaczki szpikowej. Efekt ten był osiągany poprzez indukcję zaprogramowanej śmierci komórek, co było wynikiem hamowania aktywności kinazy AbI [23]. Co ciekawe, obecność ugrupowania nitrofenylowego w strukturze pochodnej tiomocznika sprzyjała aktywności cytotoksycznej związku wobec różnych nowotworów litych, takich jak rak płuca, jelita grubego, prostaty oraz piersi. Mechanizm działania związany był z inhibicją enzymu kinazy mitogenowej (MK-2) [24, 25]. Wydaje się, że modyfikacja struktury halogenowych analogów diarylomocznika może otworzyć drogę do nowoczesnych terapii różnych rodzajów raka piersi. Związki z tej grupy zwiększały aktywację kinazy białkowej aktywowanej AMP (AMPK), co prowadziło do zahamowania syntezy kwasów tłuszczowych i zmniejszenia przepływu metabolitów w komórkach nowotworowych [26]. Zwraca również uwagę aktywność biologiczna nowych pochodnych 1,3-fenyl(bis)tiomocznika, które wpływały na indukcję śmierci komórek nowotworowych poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego na etapie prometafazy, natomiast

bromopochodne diarylotiomocznika powodowały zatrzymanie komórek w fazie S. Działanie tych związków prowadziło do wyraźnych zmian morfologicznych w elementach komórek nowotworowych, takich jak błona plazmatyczna, lizosomy oraz mitochondria [27-29]. Ciekawym jest fakt, że tio(mocznik) jest już elementem kilku leków przeciwnowotworowych takich jak sorafenib, czy tenovin-1. Pierwszy z nich działa jako inhibitor licznych kinaz tyrozynowych receptorów np. VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR)- β , KIT, FLT-3, RET, RET/PTC oraz wewnątrzkomórkowych kinaz serynowo-treoninowych należących do kaskady MAPK, które odgrywają kluczową rolę w progresji nowotworów i angiogenezie [20, 30]. Natomiast Tenovin-1 jest znany jako inhibitor deacetylazy sirtuinowej, który działa poprzez modulację aktywności sirtuin, szczególnie SIRT1 i SIRT2 [31].

Jak widać, motyw strukturalny 1,3-dwupodstawionych pochodnych tiomocznika stanowi bazę dla szerokiej gamy związków wykazujących działanie przeciwnowotworowe, które jednocześnie są nietoksyczne dla prawidłowych komórek [32, 33]. W związku z tym badania prowadzące do poznania zależności struktura-aktywność pochodnych tiomocznika pozwoliły na zaprojektowanie nowych, skuteczniejszych związków o większej selektywności i farmakokinetyce. Dodatkowo, wprowadzenie atomu fluoru lub grupy trifluorometylowej do szkieletu cząsteczki może zwiększać stabilność metaboliczną i chemiczną, poprawiać profil farmakokinetyczny (tj. przenikalność przez błony) oraz biodostępność, a także zwiększać powinowactwo wiązania związków do docelowego białka [34].

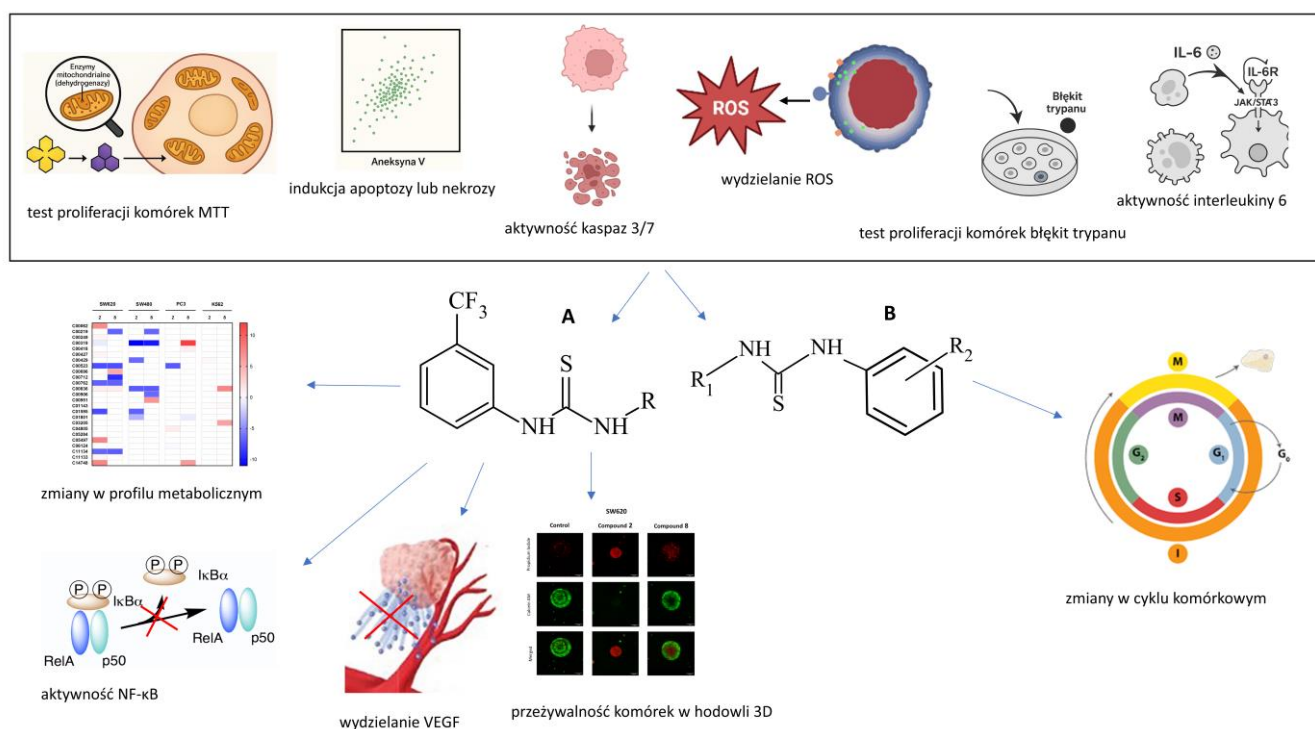
Mając na uwadze przedstawione wcześniej zagadnienia, interesującym kierunkiem badawczym okazała się modyfikacja 1,3-dwupodstawionych pochodnych tiomocznika. Celem pracy było zbadanie wpływu zmian strukturalnych na aktywność cytotoksyczną uzyskanych pochodnych wobec komórek raka jelita grubego, prostaty, jak również białaczki. Nowe pochodne oparte na strukturze tiomocznika zostały zaprojektowane i zsyntetyzowane przez dr hab. n. farm. Annę Bielenicę z Katedry i Zakładu Biochemii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Otrzymane związki zostały następnie poddane testom przesiewowym pod kątem aktywności cytotoksycznej w różnych typach linii komórkowej. Analiza wyników pozwoliła na identyfikację najefektywniejszych pochodnych co umożliwiło dalsze, pogłębione badania mechanizmów ich działania cytotoksycznego.

Opisywane osiągnięcie naukowe obejmuje trzy prace doświadczalne (**P1–P3**). Prezentowane badania koncentrują się na identyfikacji skutecznych i selektywnych związków, które mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii nowotworów. W pierwszej publikacji (**P1**) skupiałam się na możliwych mechanizmach aktywności cytotoksycznej serii analogów 3-(trifluorometylo)fenylotiomocznika. Spośród grupy 12 halogenopochodnych, wyselekcjonowałam dwie: 3,4-dichloro- i 3-trifluorometylową, charakteryzujące się największym potencjałem cytotoksycznym. Umożliwiło to przeprowadzenie kolejnych, bardziej zaawansowanych badań nad mechanizmami cytotoksycznego działania tych pochodnych, które zostały opisane w publikacji drugiej (**P2**). Z kolei w trzeciej pracy (**P3**) poddałam ocenie cytotoksyczność 16 nowych halogenowych pochodnych tiomocznika. W celu zapewnienia zmienności strukturalnej, pula podstawników była zróżnicowana i zawierała pochodne karbazolowe, bifenylowe oraz fenyłowe. Wybrane związki o najwyższej bioaktywności i wysokiej selektywności zostały poddane dalszym badaniom, które pozwoliły określić mechanizmy ich działania przeciwnowotworowego.

Założenia i cel pracy

1,3-dwupodstawione pochodne tiomocznika zawierające podstawniki elektronoakceptorowe w pierścieniu aromatycznym mogą modulować procesy komórkowe kluczowe w progresji nowotworu. Bioaktywność tych związków potwierdzona już efektywnie stosowanymi lekami przeciwnowotworowymi daje możliwości zaprojektowania nowych, zmodyfikowanych pochodnych, które posiadałyby zwiększony potencjał cytotoksyczny, a jednocześnie pozostawałyby bezpieczne dla komórek prawidłowych.

Celem pracy było zbadanie i poznanie mechanizmów cytotoksyczności serii 1,3-dwupodstawionych pochodnych tiomocznika oraz poznanie zależności struktura-aktywność tych analogów względem komórek nowotworowych. Analiza tych korelacji może ułatwić przyszłe, bardziej celowane podejście do modyfikacji strukturalnych pochodnych tiomocznika. Celem moich badań była identyfikacja nowych związków o lepszej selektywności, mniejszej toksyczności i wyższej biodostępności, które mogłyby stać się nowymi, efektywnymi lekami w terapii przeciwnowotworowej.

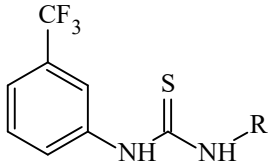


Ryc.1. Zestawienie mechanizmów aktywności cytotoksycznej badanych pochodnych tiomocznika

Publikacja 1

Prace doświadczalne rozpocząłam od oceny potencjału cytotoksycznego 1,3-dwupodstawionych pochodnych tiomocznika o zróżnicowanych układach terminalnych. W wyniku kondensacji 3-(trifluorometylo)aniliny z odpowiednimi fenyloizotiocyanianami otrzymano dwanaście pochodnych 3-(trifluorometylo)fenylotiomocznika, zawierających układy dihalogenofenyłowe (**1–4**), halogenometylofenyłowe (**5, 6**), alkilofenyłowe (**12**) lub fenyłowe monopodstawione (**7–11**) (Tabela 1). Struktury otrzymanych związków zostały potwierdzone badaniami NMR i HRMS. Przeprowadzone modyfikacje strukturalne pozwoliły na zbadanie wpływu rodzaju, ilości i miejsca położenia podstawnika w pierścieniu fenyłowym na właściwości biologiczne całej serii związków.

Tabela 1. Struktura badanych pochodnych 3-(trifluorometylo)fenylotiomocznika (prace **P1** i **P2**).

Związek	R	
1	3-Cl,4-F-Ph	
2	3-Cl,4-Cl-Ph	
3	2-Cl,4-Cl-Ph	
4	2-Cl,3-Cl-Ph	
5	2-CH ₃ ,3-Cl-Ph	
6	2-CH ₃ ,5-Cl-Ph	
7	2-CF ₃ -Ph	
8	4-CF ₃ -Ph	
9	4-Cl-Ph	
10	4-CN-Ph	
11	4-Br-Ph	
12	-CH ₂ CH ₂ -Ph	

Realizując cele pracy, oceniłam aktywność cytotoksyczną uzyskanych nowych pochodnych tiomocznika względem czterech linii komórek nowotworowych: raka jelita grubego (SW480, SW620), prostaty (PC3) i przewlekłej białaczki szpikowej (K-562) oraz linii kontrolnej prawidłowych keratynocytów (HaCaT). Jednym z najczęściej

stosowanych technik kolorymetrycznych do określenia cytotoksyczności jest test MTT, który wykorzystałam również w swoich badaniach [35]. Jest on oparty na zdolności enzymu mitochondrialnego - dehydrogenazy bursztynianowej do przekształcenia rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (bromku 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu) w nierozpuszczalne w wodzie kryształy formazanu. Po dodaniu DMSO powstaje barwny związek, którego intensywność zależy od liczby aktywnych metabolicznie (żywych) komórek. Miarą aktywności cytotoksycznej badanej substancji jest określenie stężenia hamującego, IC_{50} , dla którego wzrost i proliferacja komórek zostają zahamowane w 50%, w porównaniu do kontroli. Na podstawie analizy wartości IC_{50} stwierdziłam, że dihalogenofenyłowe pochodne (**1**, **2**, **3**, **4**) oraz *para*-podstawione pochodne tiomocznika (**8**, **9**) wykazały najwyższą aktywność przeciwnowotworową spośród badanych związków, efektywnie hamując wzrost wszystkich analizowanych linii komórkowych. Najsilniejsze działanie zaobserwowano w przypadku komórek przerzutowych raka jelita grubego SW620, które okazały się najbardziej wrażliwe spośród wszystkich badanych linii komórek nowotworowych. Najniższą wartość IC_{50} (1,5 μ M) uzyskano dla pochodnej 3,4-dichlorofenylo-tiomocznika (**2**). Natomiast pochodne zawierające atomy chloru (**2** i **5**) oraz pochodna 4-(trifluorometylo)fenylowa (**8**) skutecznie hamowały wzrost pierwotnej linii komórkowej raka jelita grubego SW480. Z kolei dla komórek K-562 zaobserwowano istotny efekt cytotoksyczny w przypadku dichloropochodnych **1** i **2**. Komórki raka prostaty okazały się najmniej podatne na działanie związków tiomocznikowych. Pochodna 4-(trifluorometylo)fenylowa (**8**) wykazała najwyższą cytotoksyczność wobec tej linii komórkowej, osiągając wartość IC_{50} równą 6,9 μ M.

Istotną cechą, którą powinien charakteryzować się dobry chemioterapeutyk jest nietoksyczność wobec zdrowych komórek. W celu porównania cytotoksyczności badanych związków wobec komórek nowotworowych z cytotoksycznością wobec komórek prawidłowych zastosowano indeks selektywności (SI), wyrażony stosunkiem IC_{50} dla normalnej linii komórkowej / IC_{50} dla linii komórek nowotworowych. Wartości wskaźnika selektywności (SI) większe niż 1 są uznawane za korzystne, ponieważ wskazują na to, że substancja działa cytotoksycznie wybiórczo na komórki nowotworowe, oszczędzając tym samym komórki zdrowe. Biorąc pod uwagę powyższą informację zaobserwowałam, że związki o najsilniejszej aktywności przeciwnowotworowej (**1–4**, **8**, **9**) wykazywały korzystny indeks selektywności mieszczący się w zakresie od 1,3-10,7, co wynikało z niskiej cytotoksyczności wobec

prawidłowych komórek linii HaCaT. Warto również zauważyć, że choć żaden z testowanych związków nie dorównał skutecznością doksorubicynie, najbardziej efektywne z nich wykazywały korzystniejszy profil cytotoksyczności w porównaniu z cisplatyną oraz wyższe wskaźniki selektywności w zestawieniu z tradycyjnymi chemioterapeutykami. Wyniki te sugerują obiecujący potencjał badanych związków w leczeniu nowotworów oraz możliwość zwiększenia bezpieczeństwa i efektywności terapii.

Wstępna ocena cytotoksyczności nowo zsyntetyzowanych pochodnych tiomocznika pozwoliła na wyselekcjonowanie związków o najlepszym potencjale przeciwnowotworowym (**1-3**, **8**, **9**) i przekierowanie ich do dalszych badań nad mechanizmem aktywności przeciwnowotworowej. Zgodnie z dobrymi praktykami prowadzenia badań cytotoksycznych, w pierwszej kolejności potwierdziłam wyniki testu MTT dla pochodnych tiomocznika testem żywotności TB (trypan blue). Barwienie błękitem trypanu wykorzystywane jest do oceny liczby i żywotności komórek nowotworowych oraz prawidłowych, które zostały poddane działaniu testowanego związku [36]. Test TB opiera się na badaniu integralności błony komórkowej, ponieważ trwałe uszkodzenia błony komórkowej prowadzą do śmierci komórki. Błękit trypanu nie wnika do żywych komórek, natomiast przenika do komórek martwych z uszkodzoną błoną komórkową, barwiąc je na niebiesko. Analiza otrzymanych danych pokazała, że najbardziej efektywna okazała się 3,4-dichlorofenyłowa pochodna **2**, redukując liczbę komórek pierwotnego i przerzutowego raka jelita grubego o około 93%. Jednocześnie związek **2** wykazał najsilniejsze właściwości cytotoksyczne, obniżając żywotność komórek SW480 i SW620 o odpowiednio 48% i 54%. Nieco mniejszą skuteczność zaobserwowałam w przypadku pochodnych **1** oraz **9** względem komórek SW480 oraz **1**, **8** i **9** wobec linii SW620. Komórki raka prostaty oraz przewlekłej białaczki szpikowej okazały się najmniej wrażliwe na działanie badanych związków. Pochodne **3** oraz **9** wykazały najsilniejszy efekt cytotoksyczny w komórkach PC3, natomiast analog **2** w komórkach K562. Warto podkreślić, że badane związki nie zmieniały liczby oraz żywotności komórek prawidłowych HaCaT, poza pochodną **2**, która obniżała oba parametry, jednak w mniejszym stopniu niż w komórkach nowotworowych.

Zmniejszona żywotność komórek nowotworowych poddanych działaniu wybranych pochodnych skłoniła mnie do bliższego przyjrzenia się mechanizmom śmierci komórkowej: apoptozie i nekrozie. Apoptoza nazywana programowaną śmiercią komórki jest uporządkowanym i ściśle regulowanym procesem umożliwiającym eliminację

nieprawidłowych komórek. Komórka apoptotyczna jest obkurczona, a jej błona komórkowa jest zachowana, dzięki czemu nie dochodzi do indukcji stanu zapalnego [37]. Mimo, że apoptoza jest nazywana „cichą śmiercią” komórki, w końcowym etapie tego procesu może dochodzić do przerywania ciągłości błony komórkowej i wycieku zawartości komórkowej na zewnątrz. Tymczasem nekroza polega na przerywaniu ciągłości błony cytoplazmatycznej komórki spowodowanym nadmiernymi uszkodzeniami pochodzenia egzogennego, co może prowadzić do masywnego odczynu zapalnego [38]. Stosując metodę cytometrii przepływowej oceniłam zdolność badanych związków do indukcji wczesnej lub późnej apoptozy bądź nekrozy w testowanych liniach komórkowych. Badane pochodne zastosowane w stężeniach równych ich wartościom IC_{50} , wywoływały znaczne nasilenie późnych etapów apoptozy lub nekrozy w komórkach nowotworowych, w porównaniu z grupą kontrolną. Efekt aktywacji apoptozy był najsilniejszy w komórkach SW480, SW620 i K-562, a najwyższą aktywność wykazano dla pochodnej tiomocznika **2**, a następnie jego analogów **1** i **8**. Pochodna dichlorofenylowa **2** oraz trifluorometylowa **8** wykazywały bardzo wysoki odsetek komórek SW480 w późnej apoptozie oraz nekrozie (odpowiednio 95% i 97%). Podobny rezultat uzyskano w komórkach SW620 traktowanych pochodną **2**. Tymczasem komórki K-562 były najbardziej podatne na działanie związków **1** oraz **2**, które indukowały głównie późną apoptozę. Spośród linii nowotworowych najmniej wrażliwe okazały się komórki raka prostaty PC3. Jedynie związek **8** wykazał najlepszy proapoptotyczny efekt, aktywując zarówno wczesną jak i późną apoptozę. Odsetek komórek apoptotycznych/nekrotycznych był stosunkowo niski w komórkach HaCaT traktowanych związkami **1**, **8** i **9**. Wyższe wartości obserwowano po inkubacji z pochodnymi **2** i **3**, jednakże oba związki wykazywały wysoką selektywność w stosunku do wybranych linii nowotworowych (pochodna **2** wobec komórek SW480, SW620 oraz K-562, natomiast związek **3** wobec komórek PC3 i SW620).

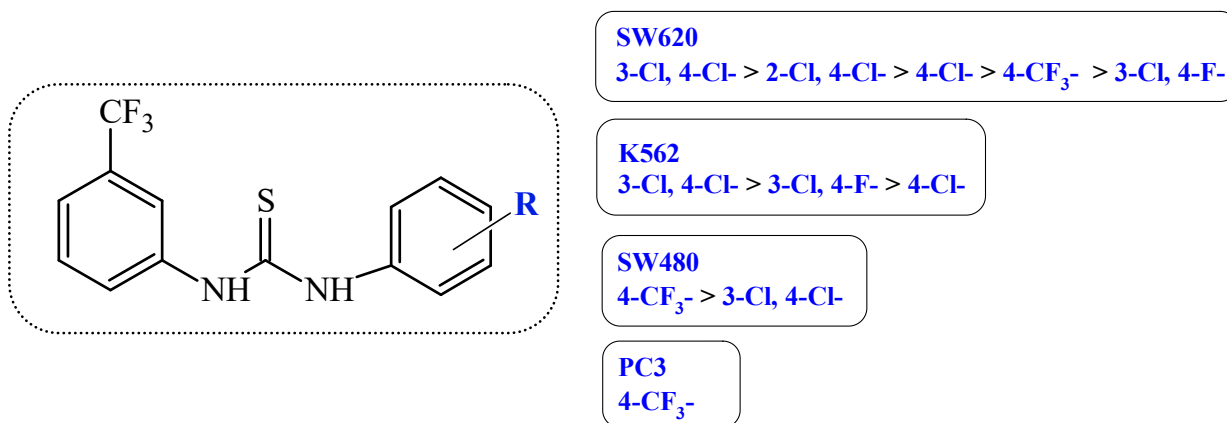
Powszechnie wiadomo, że komórki nowotworowe wyróżniają się zdolnością do zapewniania sobie stałych sygnałów wzrostowych [39]. Wytwarzają i uwalniają różne cytokiny oraz posiadają receptory powierzchniowe, w tym receptory dla cytokin, które nie występują na komórkach, z których pochodzą. Dodatkowo, komórki mikrośrodowiska guza wydzielają duże ilości czynników wzrostowych, które parakrynnie wpływają na komórki nowotworowe. Jedną z takich substancji jest prozapalna interleukina-6 (IL-6). Udowodniono, że IL-6 bierze udział w progresji nowotworów poprzez stymulację proliferacji oraz angiogenezy, a także wzrost

chemooporności komórek nowotworowych [40]. Podwyższone stężenie IL-6 stanowi niekorzystny czynnik prognostyczny w wielu nowotworach, takich jak rak jelita grubego, piersi, prostaty, skóry oraz białaczki [41]. Zatem pożądaną cechą związków ograniczających rozwój nowotworu jest zmniejszenie stężenia cytokiny IL-6 w komórkach nowotworowych. Oznaczanie aktywności interleukiny 6 wykonałam techniką immunoenzymatyczną, wykorzystującą specyficzne przeciwciała wiążące IL-6. Najsilniejszy efekt hamujący uwalniania IL-6 odnotowałam dla pochodnej **2** zarówno w komórkach raka jelita grubego pierwotnego i przerzutowego (o odpowiednio 54% i 63%). Natomiast w komórkach raka prostaty to związek **3** okazał się najbardziej skuteczny, hamując uwalnianie IL-6 o 33%.

Uzyskane dane pozwoliły na analizę zależności między strukturą a aktywnością cytotoksyczną badanych związków (Ryc. 2). Zaobserwowałam, że najbardziej wyraźny efekt cytotoksyczny związany był z obecnością dwóch atomów chlorowca w pierścieniu aromatycznym, w którym atomy chloru (**2**, **3**) lub fluoru (**1**) znajdowały się w pozycji *para*. W przypadku pochodnych monopodstawionych, najbardziej aktywne były pochodne trifluorometylowa (**8**) i chlorowa (**9**). Zastąpienie atomu chloru bardziej elektroujemnym atomem fluoru okazało się mniej korzystne w przypadku pochodnych dwupodstawionych (**2** → **1**), a jeszcze mniej zadowalający efekt uzyskałam w przypadku pochodnych monopodstawionych (**9** → **11**). Zauważyłam również znaczący spadek aktywności cytotoksycznej, gdy atom halogenu został zastąpiony grupą metylową (**5**, **6**). W grupie dichloropochodnych, najbardziej cytotoksyczny profil wykazywała pochodna 3,4-dichlorofenyłowa **2**. Zmiana położenia drugiego atomu chlorowca z pozycji 4 na 3 (związki **3** i **4**) prowadziła do stopniowego zmniejszenia aktywności biologicznej cząsteczki. Z drugiej strony, przeniesienie grupy CF₃ z pozycji *orto* (**7**) w pozycję *para* (**8**) wpłynęło na wzrost aktywności związku. Zastąpienie grupy CF₃ atomem chloru (**8** → **9**) nie zmieniło znacząco efektywności związku, natomiast zamiana na grupę nitrylową (**10**) lub atom bromu (**11**) znacznie osłabiła obserwowany efekt przeciwnowotworowy. Wprowadzenie grupy fenyloetylowej (**12**) do struktury pochodnej tiomocznika prowadziło do gwałtownego zmniejszenia bioaktywności związku.

Podsumowując uzyskane wyniki badań dla serii 3-trifluorometylofenylowych pochodnych stwierdziłam, że związki **1**, **2**, **3**, **8** oraz **9** wykazywały najsilniejszy efekt cytotoksyczny oraz największą selektywność wobec linii nowotworowych, zwłaszcza pierwotnego i przerzutowego raka jelita grubego, które wyróżniały się największą wrażliwością na badane związki. Z tej niewielkiej grupy wybrałam dwa związki o

najsilniejszych właściwościach przeciwnowotworowych: dichloropochodną **2** oraz 4-trifluorometylową pochodną **8**. Charakteryzowały się one najniższymi wartościami IC₅₀ wobec badanych linii komórkowych oraz najwyższymi wskaźnikami SI. Wyniki pogłębionych badań nad mechanizmami aktywności cytotoksycznej tych związków zostały zebrane i opisane w kolejnym artykule.



Ryc. 2. Zależność struktura - aktywność dla pochodnych 3-(trifluorometylo)fenylotiomocznika (**P1**, **P2**).

Publikacja 2

Prowadzenie wstępnych testów przesiewowych pozwala wyodrębnić spośród dużej puli związków te, które posiadają potencjał cytotoksyczny i mogą być dobrymi kandydatami do stosowania w terapii przeciwnowotworowej, zarówno samodzielnie, jak i w leczeniu skojarzonym z innymi cytostatykami. Z tego względu kolejnym etapem badań jest wyodrębnienie ścieżek metabolicznych zaangażowanych w progresję nowotworów, na które wpływają testowane związki. To pozwala poznać mechanizmy bioaktywności i zaplanować kolejne etapy już bardziej zaawansowanych badań *in silico* i *in vivo*.

Aby potwierdzić wykazane wcześniej działanie proapoptotyczne związków **2** i **8**, a także sprawdzić ścieżkę indukcji apoptozy, zbadalam aktywność kluczowych proteaz w tym procesie - kaspaz 3/7. Wśród tej grupy enzymów, kaspaza 3 jest główną kaspazą wykonawczą, która bierze udział w rozkładzie wielu białek np. topoizomerazy I czy STAT-1, a także w kondensacji chromatyny czy degradacji DNA [42]. Kaspaza-3 odgrywa istotną rolę w apoptozie indukowanej przez leki cytotoksyczne, radioterapię lub immunoterapię, co czyni ją wiarygodnym wskaźnikiem skuteczności terapii

przeciwnowotworowej [43, 44]. Obie pochodne tiomocznika zwiększały aktywność kaspaz 3/7 w liniach komórek nowotworowych, nie wykazując wpływu na ich aktywność w prawidłowych komórkach HaCaT. Warto zauważyć, że związek **2** wykazywał 1,3-2-krotnie większy potencjał do aktywacji tych enzymów niż związek **8**, a obserwowane zmiany korelowały z wcześniejszymi wynikami uzyskanymi metodą cytometrii przepływowej. Zatem aktywacja tych enzymów może wskazywać na ich udział w procesie apoptozy indukowanej przez badane pochodne tiomocznika.

Komórki nowotworowe posiadają różnorodne mechanizmy ochrony przed apoptozą, co sprawia, że są odporne na czynniki wywołujące ich śmierć [45]. W efekcie prowadzi to do ograniczonej skuteczności terapii przeciwnowotworowych. Jednym z takich mechanizmów jest zwiększone stężenie reaktywnych form tlenu (RFT) wynikające ze zmienionego metabolizmu, hipoksji, przewlekłego stanu zapalnego bądź mutacji [46]. Takie warunki sprzyjają procesom proliferacji, angiogenezy i migracji komórek nowotworowych [47]. Jednak z drugiej strony powodują one zwiększenie wrażliwości komórek na czynniki zewnętrzne, takie jak związki cytotoksyczne [48]. Zastosowanie chemioterapeutyków generujących reaktywne formy tlenu może skutkować przekroczeniem poziomu granicznego RFT oraz zniszczeniem mechanizmów adaptacyjnych, takich jak obrona antyoksydacyjna, doprowadzając do indukcji śmierci komórek nowotworowych. Aby sprawdzić czy badane pochodne tiomocznika wykazują zdolność do wytwarzania RFT, zbadalam ich poziom metodą spektrofluorometryczną, wykorzystując CellROX® Green Reagent. Oba badane związki wykazywały selektywne działanie wobec komórek nowotworowych, nie wpływając na poziom wolnych rodników tlenowych w prawidłowych komórkach HaCaT. Pochodna **2** dwukrotnie zwiększyła ilość utworzonych reaktywnych form tlenu zarówno w komórkach raka jelita grubego SW480 oraz SW620, a także w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej K562. Natomiast pochodna **8** okazała się być skuteczniejszym prooksydantem w komórkach raka prostaty, gdzie również dwukrotnie podwyższyła poziom RTF. Kolejnym ważnym mechanizmem biorącym udział w procesie onkogenezy oraz progresji nowotworu jest zwiększona ekspresja czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Stała aktywacja NF- κ B została zaobserwowana w wielu typach guzów litych takich jak rak piersi, trzustki, jelita grubego, płuc, prostaty oraz w nowotworach hematologicznych (chłoniaki, białaczki) [49]. Rola tego czynnika transkrypcyjnego w komórkach nowotworowych polega na działaniu antyapoptotycznym, stymulacji proliferacji, angiogenezy, przerzutowania oraz wzroście chemio- i radiooporności, stąd obecne podejścia terapeutyczne koncentrują się na

hamowaniu jego aktywacji [50]. W celu oceny wpływu wybranych pochodnych tiomocznika (**2 i 8**) na aktywację czynnika NF- κ B, przeprowadzono test ELISA (NF- κ B p65 Total/Phospho). Test ten opiera się na aktywacji NF- κ B w wyniku fosforylacji, co oznacza, że wyższy stosunek fosforylowanej formy do całkowitej ilości NF- κ B świadczy o zwiększonej aktywacji tego czynnika transkrypcyjnego.

Analiza wyników pokazała, że obydwie pochodne tiomocznika wykazały działanie hamujące aktywację NF- κ B w komórkach nowotworowych, podczas gdy w nienowotworowych komórkach HaCaT nie zaobserwowano takiego efektu. Najsilniejszy spadek aktywności NF- κ B, o 63%, zaobserwowano w komórkach raka prostaty po inkubacji z pochodną **2**. Natomiast związek **8** zmniejszył aktywność tego czynnika transkrypcyjnego o 34% w porównaniu z kontrolą. Redukcja aktywności NF- κ B w komórkach białaczki była podobna dla obu związków i wynosiła około 30%. Zbliżony efekt hamujący zaobserwowano także w pierwotnych (SW480) oraz przerzutowych (SW620) liniach komórek raka jelita grubego. Uzyskane wyniki są obiecujące, biorąc pod uwagę różnokierunkową, lecz negatywną funkcję NF- κ B w rozwoju nowotworu. Aby komórka nowotworowa mogła wzrastać, rozprzestrzeniać się i tworzyć przerzutowe kolonie w odległych miejscach organizmu potrzebny jest proces angiogenezy [51]. W procesie tym bierze udział wiele angiogennych czynników wzrostu, wydzielanych przez komórki nowotworowe, w tym naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF). Nadmierna ekspresja VEGF jest związana z bardziej agresywnymi i przerzutowymi typami nowotworów. Co ciekawe, dane literaturowe wskazują VEGF jako istotny czynnik progresji nowotworów hematologicznych, indukując odpowiedzi mitotyczne, inicjując wzrost, wspierając przeżycie i migrację, a także zwiększając zdolność samoodnowy progenitorowych komórek białaczkowych [52, 53]. Właściwości anty-angiogenne badanych pochodnych tiomocznika sprawdziłam testem ELISA, badając ich zdolność do hamowania sekrecji VEGF we wszystkich testowanych liniach komórkowych. Oba związki zmniejszały wydzielanie VEGF, w szczególności w komórkach PC3 (od 55 do 68%) oraz K-562 (o 55%), a w mniejszym stopniu w pierwotnym i przerzutowym raku jelita grubego (od 18 do 46%). Podobnie, hamujący wpływ na proces angiogenezy uzyskano dla pochodnych tiomocznika, syntetyzowanych na bazie klinicznie stosowanego sorafenibu. Związki te hamowały aktywność receptora VEGF (VEGFR2) m.in. w liniach komórkowych białaczki i niedrobnokomórkowego raka płuca A549 [54, 55]. Wpływ badanych pochodnych tiomocznika na zahamowanie procesu angiogenezy, zwłaszcza w przerzutowych liniach PC3 oraz SW620 jest

szczególnie istotny, gdyż proces ten jest kluczowy dla migracji i inwazji komórek nowotworowych, przyczyniając się do zwiększenia śmiertelności. W związku z tym hamowanie procesu angiogenezy za pomocą pochodnych tiomocznika może stanowić skuteczną strategię poprawy skuteczności terapii nowotworowej.

Zmiany metaboliczne w komórkach nowotworowych np. efekt Warburga czy glutaminoliza, odgrywają kluczową rolę zarówno w procesie kancerogenezy, jak i progresji nowotworu, wpływając na różne procesy komórkowe, takie jak wzrost, autofagia, apoptoza oraz oporność na leczenie [56]. Zatem powstało pytanie, czy nowo zsyntetyzowane związki zmieniają profil metaboliczny komórek nowotworowych. Dlatego kolejnym celem moich badań było przeprowadzenie analizy metabolomicznej przy użyciu spektrometrii mas we współpracy z dr Andrzejem Ciechanowiczem z Zakładu Medycyny Regeneracyjnej WUM, działającego w ramach Centrum Badań Przedklinicznych CEPT WUM. Identyfikacja związków za pomocą programu MetaboAnalyst 5.0 i bazy KEGG wykazała istotne zmiany w szlakach metabolicznych w komórkach nowotworowych, takich jak przemiany kwasu arachidonowego, steroidów, sfingolipidów i pirymidyn. Najbardziej istotne zmiany zaobserwowano w linii przerzutowego raka jelita grubego (SW620) i dotyczyły one obniżenia poziomu kwasu arachidonowego i oleinowego, a także hormonów steroidowych: testosteronu, androsteronu i kortyzonu. Wpływ hormonów na progresję nowotworu okrężnicy (CRC) jest zróżnicowany. Podczas gdy glikokortykoidy oraz androgeny mogą sprzyjać rozwojowi procesu nowotworowego, estrogeny i progesteron wykazują działanie hamujące [57-59]. Obecne w mikrośrodku guza glikokortykoidy mogą modulować komponenty odpowiedzi immunologicznej i przeciwnowotworowej, sprzyjając immunosupresji i umożliwiając nowotworowi skuteczne omijanie mechanizmów nadzoru immunologicznego [60]. Tymczasem kwas arachidonowy (AA) wykazuje zarówno pro-, jak i antynowotworową aktywność. Z jednej strony może pełnić rolę sygnału apoptotycznego regulując procesy apoptozy [61]. Z drugiej strony AA ulega metabolizmowi, prowadząc do produkcji prostaglandyn (PG), z których wiele, zwłaszcza PGE₂, gromadzi się i sprzyja stanom zapalnym oraz progresji nowotworu [62]. Jednakże w naszych badaniach pochodna **8** podwyższała poziom prostaglandyny D₂ w komórkach SW620. Prostaglandyna D₂ (PGD₂) wydaje się hamować progresję nowotworu, ograniczając rozwój gruczolakoraka żołądka na drodze hamowania szlaku aktywowanego przez receptor gamma proliferatora peroksysomów (PPAR γ) oraz regulację mikrośrodowiska guza, co zmniejsza nadmierne reakcje związane z

przepuszczalnością naczyń i produkcją TNF- α (czynnika martwicy nowotworów- α) [63, 64]. Niemniej jednak nadal prowadzone są badania mające na celu jednoznaczne określenie jej roli w CRC. Natomiast podwyższony poziom argininy po ekspozycji komórek SW620 na związek **2** może mieć przeciwny skutek. Z jednej strony arginina i jej metabolity, takie jak poliaminy i tlenek azotu (NO), są niezbędne w rozwoju nowotworów [65]. Z drugiej strony arginina jest kluczowa dla proliferacji, różnicowania i przeżycia naciekających limfocytów T (TILs). Zatem zwiększenie poziomu argininy i zahamowanie jej metabolitów może zahamować progresję nowotworu poprzez wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej. Pochodna **2** zainicjowała korzystne zmiany w pierwotnych komórkach raka jelita grubego, a mianowicie obniżył poziom sfingozyny i sfinganiny. Metabolit sfingozyny, sfingozyno-1-fosforan (S1P), odgrywa kluczową rolę w procesach związanych z nowotworzeniem, takich jak stany zapalne i tworzenie nowych naczyń krwionośnych [66, 67]. Modulatory sfingolipidowego szlaku sygnałowego mogą więc stanowić dobry punkt uchwytu dla nowych terapii przeciwnowotworowych.

Z kolei profil metaboliczny komórek PC3 zmieniał się w zależności od zastosowanego związku. Po ekspozycji komórek ze związkiem **2** odnotowano wzrost poziomu 5-HETE oraz spadek stężenia androsteronu i sfingozyny. Natomiast po zastosowaniu związku **8** ich poziomy były wyższe, a jedynym zaobserwowanym spadkiem była ilość deoksyrybozy. Sugeruje to, że działanie związku **2** mogło prowadzić do bardziej korzystnych zmian metabolicznych, zmniejszając ilość metabolitów kluczowych w progresji nowotworu [68]. Tymczasem w komórkach białaczkowych po inkubacji ze związkiem **8** zaobserwowano zwiększoną aktywność metabolizmu sfingolipidów, cholesterolu i hormonów steroidowych, co może sprzyjać dalszemu rozwojowi nowotworu [69].

Analiza metabolomiki wykazała, że pochodne tiomocznika ujawniły znaczące i interesujące zmiany w komórkach przerzutowego raka jelita grubego. Zatem w kolejnym etapie oceniono cytotoksyczność obu związków w trójwymiarowej hodowli komórkowej SW620. Hodowle komórkowe 3D to modele, które lepiej odwzorowują warunki panujące w guzie nowotworowym i mikrośrodoisku niż tradycyjne hodowle 2D [70]. W badaniach cytotoksyczności związków są one bardziej precyzyjne, ponieważ komórki w hodowlach 3D lepiej odzwierciedlają dostęp do substancji odżywczych i leku. Modele te pozwalają badać interakcje międzykomórkowe i mikrośrodoisko, co jest ważne przy ocenie terapii przeciwnowotworowych. Ocenę żywotności komórek analizowano za

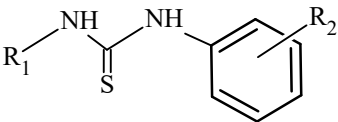
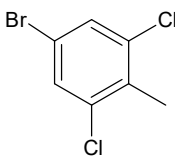
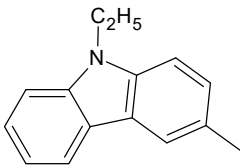
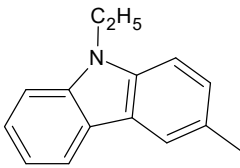
pomocą mikroskopu konfokalnego FV10-ASW 4.2 Olympus oraz programu ImageJ. Badania przeprowadzone we współpracy z dr Jarosławem Szczepaniakiem z Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW wykazały, że związek **2** wykazał silniejszy efekt cytotoksyczny niż związek **8**, co potwierdzono wyższą intensywnością fluorescencji (FI) jodku propidyny. Analiza FI przy użyciu programu ImageJ wykazała 73% spadek żywotności komórek SW620 po inkubacji ze związkiem **2**, w porównaniu do 85% w grupie kontrolnej. Natomiast odsetek żywych komórek SW620, eksponowanych na działanie związku **8**, zmniejszył się o 16%. Co istotne, żywotność sferoidów SW620 eksponowanych na działanie związku **2** była znacznie niższa niż w hodowli 2D, co sugeruje potencjalnie korzystny profil biodostępności związku **2**.

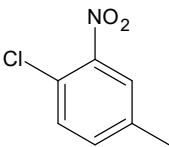
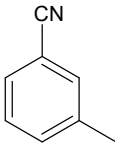
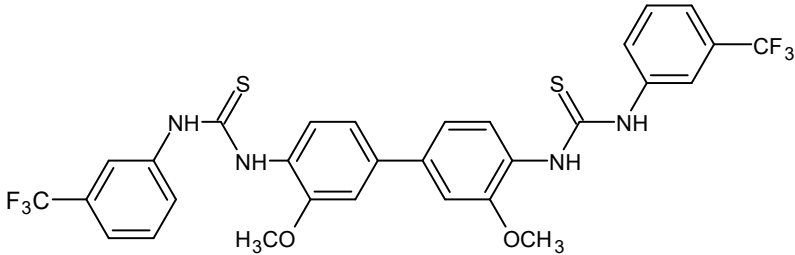
Podsumowując, nasze badania potwierdziły anty-apoptotyczne właściwości obu pochodnych tiomocznika, obserwowane przez zwiększoną aktywację kaspaz 3/7. Podwyższone stężenie reaktywnych form tlenu bądź zahamowanie aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B może prowadzić do indukcji programowej śmierci komórki. Z kolei, obniżony poziom NF- κ B może przyczyniać się do spadku wydzielania VEGF, istotnego czynnika biorącego udział w procesie angiogenezy. Co ważne, analiza metabolomiczna wykazała najbardziej istotne zmiany w komórkach przerzutowych raka jelita grubego SW620. Otrzymane wyniki są obiecujące, zważywszy na fakt, że zaistniałe zmiany są w większości efektywne dla supresji nowotworu i dotyczą linii przerzutowych, które cechuje większa złośliwość i oporność na leczenie. Oba związki indukowały też korzystne zmiany w profilu metabolicznym w komórkach pierwotnego raka jelita grubego, a związek **2** także w komórkach przerzutowego raka prostaty. Tymczasem w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej K-562, zmiany w profilu lipidowym korzystne dla progresji nowotworu mogą skutkować gorszą odpowiedzią na działanie pochodnych i dawać słabszy efekt w testach cytotoksyczności. Warto również podkreślić, że cytotoksyczny charakter obu związków został potwierdzony w hodowli 3D komórek SW620, która odzwierciedla naturalne mikrośrodowisko rozwoju nowotworu. Pochodna **2** wykazywała większy spadek żywotności sferoidów w porównaniu do hodowli 2D, co może wskazywać na korzystny profil biodostępności tego związku. Nasze badania wykazały, że badane pochodne **2** i **8** wykazują wysoki potencjał przeciwnowotworowy i mogą być stosowane w terapii onkologicznej, tym bardziej, że zachowują dobry poziom bezpieczeństwa dla komórek prawidłowych.

Publikacja 3

Obiecujące wyniki dotychczas przeprowadzonych badań skłoniły mnie do dalszego poszukiwania nowych pochodnych tiomocznika o wysokim potencjale przeciwnowotworowym. W tym celu wykonałam badania aktywności biologicznej kolejnej serii związków, która obejmowała 16 nowych pochodnych difenylotiomocznika o różnorodnej strukturze, zsyntetyzowanych również przez dr hab. n. farm. Annę Bielenicę w Katedrze i Zakładzie Biochemii WUM. Pierścienie aromatyczne amin (R_1) stanowiły głównie podstawione pochodne benzenu, jak również heterocykliczny układ karbazolu (Tabela 2). Włączenie pochodnych karbazolowych, które zostały opisane jako cytotoksyczne [71], miało na celu porównanie właściwości biologicznych cząsteczek zawierających skondensowane pierścienie heterocykliczne (**2a**, **2b**) z pochodnymi bifenyłowymi (**4a**) oraz fenylotiomocznikowymi (**1a**, **3a**, **3b**, **5a–5j**). Pierścienie fenylowe badanych pochodnych zawierały różnorodne podstawniki (R_2), takie jak $-\text{CF}_3$, $-\text{NO}_2$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{CN}$ czy atomy chlorowca. Jak wskazują dane literaturowe, obecność grup silnie ($-\text{NO}_2$, $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$) lub słabo ($-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$) elektronoakceptorowych, a także podstawnika o charakterze elektronodonorowym ($-\text{OCH}_3$), ma decydujący wpływ na aktywność biologiczną pochodnych tiomocznika.

Tabela 2. Struktura badanych pochodnych tiomocznikowych (praca P3)

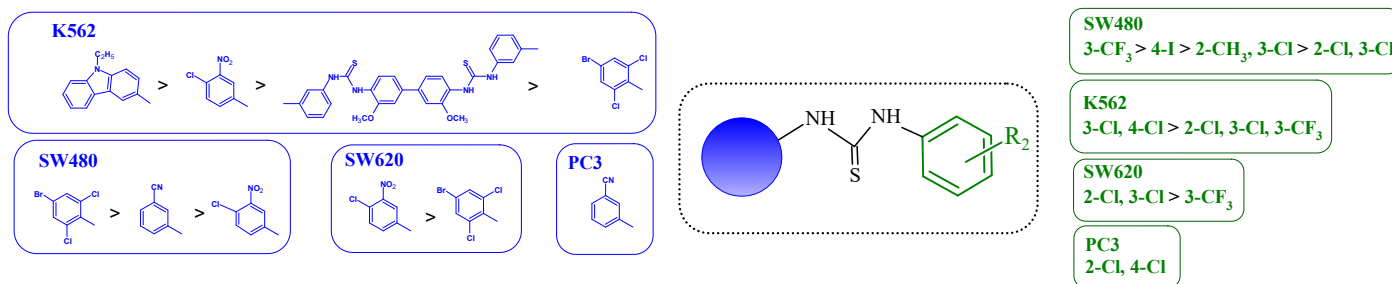
		
Związek	R_1	R_2
1a		3- CF_3
2a		3-Cl-4-F
2b		3-Cl-4-Cl

3a		2-Cl-3-Cl
3b		2-CH ₃ -3-Cl
5a		3-CF ₃
5b		3-Cl-4-F
5c		3-Cl-4-Cl
5d		2-Cl-4-Cl
5e		2-Cl-3-Cl
5f		2-Cl
5g		4-Cl
5h		3-Br
5i		4-Br
5j		4-I
4a		

W celu analizy i porównania właściwości przeciwnowotworowych nowych związków z pochodnymi 3-(trifluorometylo)fenylotiomocznika (prace **P1** i **P2**), badania przeprowadziłam na tych samych liniach komórkowych guzów litych (SW480, SW620, PC3), nowotworze hematologicznym (K-562) oraz na prawidłowych keratynocytach (HaCaT). Opierając się na analizie cytotoksyczności nowej serii związków, wykonanej z wykorzystaniem testu MTT, wytypowałam siedem pochodnych o najwyższej aktywności przeciwnowotworowej ($IC_{50} < 10 \mu M$) wobec przynajmniej jednej linii komórkowej. Związki **1a** oraz **3a** wykazały najszersze działanie cytotoksyczne, obserwowane wobec trzech linii komórkowych: pierwotnego i przerzutowego raka jelita grubego (SW480, SW620) oraz białaczki K-562. Natomiast pozostałe badane pochodne były bardziej selektywne w stosunku do jednej linii komórkowej: **3b** i **5j** do SW480, **5d** do PC3, **2b** i **4a** wobec K-562. Linie komórkowe SW480 oraz K-562 okazały się

najbardziej wrażliwe na obecność pochodnych tiomocznikowych, podczas gdy komórki raka prostaty PC3 charakteryzowały się wyższą opornością. Warto podkreślić, że badane analogi tiomocznika miały mniejszą cytotoksyczność wobec prawidłowej linii komórkowej HaCaT w porównaniu do wybranych leków referencyjnych, doksorubicyny i cisplatyny. Co więcej, wiele związków było bardziej skutecznych wobec komórek SW480 (**1a**, **3a**, **3b**, **5j**), K-562 (**2b**, **3a**, **4a**) oraz PC3 (**5d**) niż standardowo używana cisplatyna, z kilkukrotnie korzystniejszymi wskaźnikami selektywności (SI) i niższymi wartościami IC₅₀.

W kolejnym etapie badań przeanalizowałam zależność między uzyskanymi wynikami cytotoksyczności, a budową badanych związków (Ryc. 3). Zauważyłam, że pochodne 4-bromo-2,6-dichlorofenyłowa (**1a**) oraz 4-chloro-3-nitrofenyłowe (**3a**, **3b**) tworzyły najbardziej cytotoksycznie aktywną grupę, skuteczną wobec trzech linii komórek nowotworowych: SW480, SW620 oraz K-562. Wprowadzenie grupy nitrylowej do pierścienia benzenu w miejsce atomu chlorowca (**1a** → **5a**, **3a** → **5e**, **2b** → **5c**) znacząco osłabiło efekt cytotoksyczny danej pochodnej. Wyjątek stanowiły 2-chloro-4-chloro- (**5d**) oraz 3-bromofenylopo pochodna (**5h**), aktywne wobec komórek PC3 i K-562. Z kolei zamiana atomu bromu (**5i**) na jod (**5j**) w pozycji *para* pierścienia fenyłowego skutkowałą wzrostem cytotoksyczności wobec komórek SW480. Wprowadzenie układu 9-etylo-9H-karbazolu (**2a**) w miejsce pierścienia fenyłowego doprowadziło do zmniejszenia aktywności biologicznej. W tej grupie związków wysoką cytotoksyczność wobec komórek K-562 zaobserwowałam tylko dla dichlorofenylopo pochodnej **2b**. Ponadto, biorąc pod uwagę drugi fragment terminalny, dwupodstawione pochodne zawierające co najmniej jeden atom chloru (**2b**, **3a**, **3b**, **5d**), jak również analogi z podstawnikiem CF₃ w pozycji *meta* (**1a**, **4a**), wykazywały silne działanie cytotoksyczne. Obecność grupy 3-CF₃ warunkowała cytotoksyczność wobec komórek K-562 (**1a**, **4a**, **5a**) oraz SW480/SW620 (**1a**, **5a**), z wysokim współczynnikiem selektywności (SI) w stosunku do komórek zdrowych. Porównując jednopodstawione pochodne halogenofenyłowe, zauważyłam wzrost cytotoksyczności wobec komórek SW480 dla 4-jodofenylopo pochodnej (**5j**) oraz wobec linii PC3 i K-562 dla pochodnej 3-bromofenyłowej (**5h**). W przypadku dwupodstawionych chlorowcopo pochodnych, obecność fragmentu 2,3-dichlorofenyłowego (**3a**) warunkowała najwyższą aktywność wobec trzech linii komórek.



Ryc. 3. Zależność struktura-aktywność w grupie badanych pochodnych tiomocznika (P3)

Obecnie uznaje się, że dobrymi kandydatami na leki przeciwnowotworowe są takie substancje, które wykazują nie tylko wysoką aktywność i selektywność, ale także odpowiedni profil farmakokinetyczny. Jednym z kluczowych parametrów w badaniach nad projektowaniem leków jest lipofilność, wyrażona jako logP. Przyjmuje się, że optymalny zakres lipofilowości dla biernej przenikalności przez błonę wynosi od 1 do 3, a następnie rozszerza się na bardziej lipofilowy przedział od 3 do 5 [72]. Lipofilowość dobrego, aktywnego leku powinna być jednocześnie wystarczająco wysoka, aby umożliwić odpowiednią przenikalność przez błony biologiczne oraz wiązanie z celem molekularnym, oraz na tyle niska, aby zapewnić rozpuszczalność w środowisku wodnym i zapobiec niepożądanym właściwościom leku. Pozwala to uniknąć nadmiernego metabolizmu, silnego wiązania z białkami osocza, aktywności poza celem (off-target) oraz gromadzenia się leku w tkankach. Lipofilowość silnie aktywnych pochodnych tiomocznika, określona na podstawie wartości iLogP, mieściła się w zakresie od 2,57 do 4,19, osiągając wartość optymalną 3,45 dla najbardziej aktywnej pochodnej trihalogenofenylowej **1a**. Dla porównania, wartości iLogP wszystkich mniej aktywnych analogów 2-cyjanofenyliotiomocznika były niższe i wynosiły od 2,37 do 2,62. Uzyskane parametry wskazują na zasadność dalszych, bardziej zaawansowanych badań nad ich terapeutycznym zastosowaniem.

Analiza cytotoksyczności pozwoliła na wyselekcjonowanie najbardziej obiecujących pochodnych (**1a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4a**, **5d**, **5j**), które następnie poddano rozszerzonym badaniom w celu określenia mechanizmów ich działania cytotoksycznego. Na początku oceniono zdolność związków do indukowania apoptozy lub nekrozy w komórkach nowotworowych i zdrowych metodą cytometrii przepływową. Badania te wykonano we współpracy z dr Ewelina Kiernożek z Zakładu Immunologii Instytutu Biologii Funkcjonalnej i Ekologii UW. Co ciekawe, najsilniejszy efekt proapoptotyczny

zaobserwowano w komórkach K-562. Spośród badanych związków, halogenowane pochodne **1a** i **3a** wykazywały najwyższą skuteczność w indukcji wczesnej apoptozy (w zakresie 82-89%), natomiast pochodne tiomocznika **2b** i **4a** aktywowały zarówno wczesne (od 34 do 40%), jak i późne (od 12 do 15%) etapy tego procesu. Pochodna **1a** była również najbardziej aktywna w komórkach SW480, zwiększając ich odsetek w stadium nekrozy (ok. 20%). Z kolei pochodna **5d**, jedyna wykazująca działanie cytotoksyczne w komórkach PC3, aktywowała proces późnej apoptozy (36%). Komórki SW620 były najmniej wrażliwe na obecność badanych związków **1a** oraz **3a**, które słabiej indukowały odpowiednio wczesną apoptozę i nekrozę (<10%). Warto podkreślić, że analizowane pochodne tiomocznika nie wywoływały procesów apoptotycznych w prawidłowych komórkach HaCaT. Co więcej, indukowana przez te związki w komórkach nowotworowych apoptoza była zależna od kaspaz. Badanie aktywności kaspaz 3/7 przeprowadzono za pomocą testu Caspase Glo-3/7 na wszystkich liniach poza komórkami SW620, które wykazywały słabą podatność na apoptozę po inkubacji z wybranymi pochodnymi. Największy, czterokrotny wzrost aktywności kaspaz 3/7 zaobserwowano w komórkach SW480, inkubowanych z pochodną **1a**. Wszystkie testowane substancje zwiększały aktywność kaspaz 3/7 w komórkach białaczkowych K-562, przy czym związki **1a** oraz **3a** trzykrotnie. Aktywacja kaspaz w komórkach HaCaT, inkubowanych z badanymi pochodnymi tiomocznika, była porównywalna do komórek kontrolnych w każdym punkcie czasowym.

Badania *in vitro* pochodnych tiomocznika wykazały podobne mechanizmy sprzyjające apoptozie, poprzez szybkie uwolnienie reaktywnych form tlenu (RTF), zaburzenie potencjału błony mitochondrialnej (MMP), uwolnienie cytochromu c, a następnie aktywację kaspaz 3/7/9 [11]. Apoptoza jest często poprzedzona zmianami w profilu cyklu komórkowego, dlatego kolejnym etapem naszych badań było prześledzenie wpływu pochodnych tiomocznika na cykl komórkowy metodą cytometrii przepływowej z zastosowaniem barwienia jodkiem propidyny (PI). Zaobserwowałam, że badane związki powodowały zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 w komórkach SW480, a także w komórkach K-562 inkubowanych z pochodną **3a**. Faza G1 jest bardzo istotną częścią cyklu komórkowego, ponieważ dostarcza sygnał, który umożliwia komórce przejście do etapu podziału komórkowego [73]. Z kolei, inkubacja komórek K562 ze związkiem **2b** spowodowała zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M. Zahamowanie na tym etapie cyklu może świadczyć o uszkodzeniach DNA lub zaburzeniach w formowaniu wrzeciona podziałowego [73]. Ponadto, większość

badanych pochodnych znacząco zwiększała populację komórek nowotworowych w fazie sub-G1, co wskazuje na ich działanie cytotoksyczne i indukcję apoptozy. Podobne rezultaty uzyskano dla wielu pochodnych tiomocznika, które hamując cykl komórkowy indukowały programową śmierć komórki w komórkach nowotworowych [21, 74].

W poszukiwaniu potencjalnego inhibitora wydzielania IL-6, wybrane komórki nowotworowe poddano działaniu pochodnych tiomocznika w stężeniach odpowiadających ich IC₅₀. We wszystkich przypadkach odnotowano istotne działanie biologiczne. Dichlorofenyłowa pochodna **3a** wykazała znaczną aktywność hamującą IL-6 zarówno w pierwotnych komórkach SW480 (o 65%), jak i przerzutowych komórkach SW620 raka jelita grubego (o 73%). Podobną odpowiedź zaobserwowano w komórkach SW480 po zastosowaniu związku **5j** (o 67%). Największy wpływ stwierdzono jednak w przerzutowych komórkach PC3, gdzie analog **5d** pięciokrotnie obniżył wydzielanie interleukiny-6. Co ciekawe, w komórkach HaCaT zaobserwowano niewielki wzrost stężenia tej cytokiny po inkubacji ze związkami **3a**, **4a** i **5d**. Jednak rola IL-6 w zdrowych tkankach jest odmienna i może mieć pozytywny charakter, co może być korzystne, na przykład w procesie wzrostu mięśni lub ochronie komórek skóry przed szkodliwymi czynnikami środowiskowymi [75].

Działanie wielu leków przeciwnowotworowych opiera się na zwiększaniu wytwarzania reaktywnych form tlenu w komórkach poprzez różne mechanizmy. Na przykład, w komórkach białaczkowych poddanych działaniu tlenku arsenu (III) może dochodzić do wycieku elektronów. Indukcja stresu w siateczce endoplazmatycznej została odnotowana w przypadku celekoksylu w raku prostaty [32]. Co więcej, skompleksowane pochodne tiomocznika wykazywały zdolność do zaburzania mechanizmów antyoksydacyjnych i detoksykacyjnych w komórkach nowotworowych [32]. Dlatego kolejnym etapem badań była ocena wpływu związków na poziom RTF metodą spektrofluorometryczną, z wykorzystaniem dihydrorodaminy (DHR-123), która opiera się na RTF-zależnym utlenianiu związków do fluorescencyjnej formy utlenionej (rodamina-123). Początkowo ilość wolnych rodników tlenu mierzona po 2 godzinach inkubacji była porównywalna z grupami kontrolnymi. Wyraźne różnice w syntezie RTF w komórkach zaobserwowano po 12-godzinnej inkubacji, przy czym poziomy te pozostały stabilne do 24 godzin. Największy (1,5-2-krotny) przyrost poziomu wolnych rodników tlenowych odnotowano w komórkach nowotworowych jelita grubego SW480 i SW620 po 24-godzinnej inkubacji z pochodnymi **1a**, **3a** i **5j**. Co warto podkreślić, pochodna tiomocznika **5j** podwoiła poziom niestabilnych cząsteczek tlenu w komórkach SW480, a związek **3a** był

szczególnie skuteczny w przerzutowych liniach SW620. Ponadto wybrane pochodne (**1a**, **3a**, **5d**) zwiększały gromadzenie reaktywnych form tlenu w liniach komórkowych PC3 i K-562 (o ok. 30%). Z kolei, zwiększenie wytwarzania RTF w komórkach HaCaT było najmniej zauważalne, co odpowiada słabej indukcji apoptozy zależnej od kaspaz, niskiej cytotoksyczności obserwowanej w teście MTT oraz braku znaczącego wpływu na cykl komórkowy. Wyniki te jednoznacznie wskazują na właściwości prooksydacyjne pochodnych tiomocznika, które skutecznie zwiększały poziomy rodników tlenowych w komórkach nowotworowych, co potencjalnie może prowadzić do indukcji apoptozy. Jednocześnie testowane związki wykazywały minimalny cytotoksyczny wpływ na komórki prawidłowe.

Podsumowując, wykonane przeze mnie badania wykazały, że związki **1a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4a**, **5d** i **5j** charakteryzowały się najwyższą cytotoksycznością wobec komórek nowotworowych ($IC_{50} < 10,7 \mu M$), konkurując tym samym z powszechnie stosowanym cytostatykiem - cisplatyną. Wśród nich pochodne **3b** i **5j** wykazały selektywną efektywność wobec komórek SW480, natomiast analog **5d** - wobec linii PC3, jednocześnie nie wywierając wpływu na komórki prawidłowe. Badane pochodne hamowały wydzielanie IL-6 w komórkach raka jelita grubego SW480 oraz SW620, a także w komórkach prostaty PC3. Ponadto zwiększały poziom wolnych rodników, co w połączeniu z wcześniej potwierdzonym osłabieniem obrony antyoksydacyjnej może dodatkowo nasilać efekt cytotoksyczny. Zmiany te mogą prowadzić do uszkodzeń struktur komórkowych, które są w stanie wpływać na zahamowanie cyklu komórkowego. Wykazałam, że badane związki zwiększały odsetek komórek nowotworowych w fazach sub-G1 (**1a**, **3a**, **5d**), G0/G1 (**3a**) oraz G2/M (**2b**), co mogło wpłynąć na indukcję procesu wczesnej lub późnej apoptozy bądź nekrozy. Pochodna dichlorofenyłowa **3a** oraz monopodstawione pochodne **1a** i **5j** są najbardziej obiecującymi związkami przeciwnowotworowymi, a identyfikacja ich profilu działania wskazuje dalszy kierunek poszukiwań potencjalnych substancji leczniczych, jak i uwidacznia nowe cele terapeutyczne w walce z chorobami nowotworowymi, i to zarówno guzami litymi jak i nowotworem hematologicznym.

Kopie opublikowanych prac



Article

Investigation of the Mechanisms of Cytotoxic Activity of 1,3-Disubstituted Thiourea Derivatives

Paulina Strzyga-Lach , Alicja Chrzanowska, Katarzyna Podsadni and Anna Bielenica *

Chair and Department of Biochemistry, Medical University of Warsaw, 02-097 Warszawa, Poland; pstrzyga@wum.edu.pl (P.S.-L.); achrzanowska@wum.edu.pl (A.C.); kpodsadni@wum.edu.pl (K.P.)

* Correspondence: abielenica@wum.edu.pl; Tel.: +(48)-022-572-06-93; Fax: +(48)-022-572-06-79

Abstract: Substituted thiourea derivatives possess confirmed cytotoxic activity towards cancer but also normal cells. To develop new selective antitumor agents, a series of 3-(trifluoromethyl)phenylthiourea analogs were synthesized, and their cytotoxicity was evaluated in vitro against the cell line panel. Compounds **1–5**, **8**, and **9** were highly cytotoxic against human colon (SW480, SW620) and prostate (PC3) cancer cells, and leukemia K-562 cell lines ($IC_{50} \leq 10 \mu M$), with favorable selectivity over normal HaCaT cells. The derivatives exerted better growth inhibitory profiles towards selected tumor cells than the reference cisplatin. Compounds incorporating 3,4-dichloro- (**2**) and 4- CF_3 -phenyl (**8**) substituents displayed the highest activity (IC_{50} from 1.5 to 8.9 μM). The mechanisms of cytotoxic action of the most effective thioureas **1–3**, **8**, and **9** were studied, including the trypan blue exclusion test of cell viability, interleukin-6, and apoptosis assessments. Compounds reduced all cancerous cell numbers (especially SW480 and SW620) by 20–93%. Derivatives **2** and **8** diminished the viability of SW620 cells by 45–58%. Thioureas **1**, **2**, and **8** exerted strong pro-apoptotic activity. Compound **2** induced late apoptosis in both colon cancer cell lines (95–99%) and in K-562 cells (73%). All derivatives acted as inhibitors of IL-6 levels in both SW480 and SW620 cells, decreasing its secretion by 23–63%.

Keywords: thiourea; cytotoxic activity; apoptosis; interleukin-6; trypan blue assay



Citation: Strzyga-Lach, P.; Chrzanowska, A.; Podsadni, K.; Bielenica, A. Investigation of the Mechanisms of Cytotoxic Activity of 1,3-Disubstituted Thiourea Derivatives. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 1097. <https://doi.org/10.3390/ph14111097>

Academic Editors: Mary J. Meegan and Niamh M O'Boyle

Received: 28 September 2021

Accepted: 26 October 2021

Published: 28 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cancer is now considered as the second cause of death after cardiovascular disorders. It is estimated that the number of newly diagnosed tumor cases will increase to 15 million episodes every year [1]. Currently, the most common method used for the treatment of cancer is chemotherapy. However, powerful chemotherapeutics also have an adverse impact on non-cancerous cells, slowing their growth and/or inducing apoptosis. Thus, the main challenge for the pharmaceutical industry is to synthesize new anticancer agents that are more effective and selective but less toxic for normal cells.

One of the most suitable strategies in the field of drug development is the combination of two bioactive nuclei. The (thio)urea branch is an element of several medicines with anticancer profiles, such as sorafenib, multikinase-inhibitory diarylthiourea derivative, or tenovin-1, the benzylthiourea, which acts as a reversible inhibitor of class III HDAC sirtuins (Figure 1). On the other hand, it was reported that (hetero)aryl terminal fragments of thiourea moiety, enriched with electron-negative substituents, could provide biological responses, not only cytotoxic [2–4], but also antibacterial [2–8], antiviral [2,9–12], antimycobacterial [5,13], antioxidant [14], and anti-inflammatory [6] properties, as well as central nervous system activation [15–18].

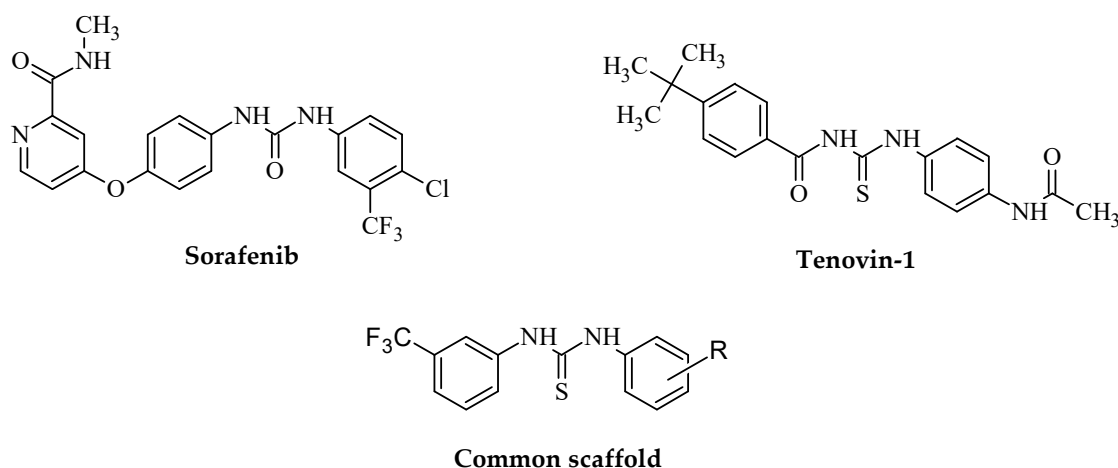


Figure 1. Anticancer agents derived from diaryl(thio)urea and the common scaffold of the designed target 3-(trifluoromethyl)phenylthioureas.

Large numbers of 1,3-disubstituted derivatives of urea and thiourea have been reported to possess antiproliferative properties against various solid and leukemia tumor cell lines, simultaneously resulting in low side effects. The most effective agents were found in a group of derivatives with electron-withdrawing substituents introduced to the terminal phenyl rings. In recent years, some trifluoromethyl- and trifluoromethoxyphenyl(thio)ureas bearing the thiochroman ring have been synthesized, which exerted an ovarian cancer cell inhibitory effect [19]. Several biphenyl thiourea derivatives, which incorporated CF_3 , nitro, and halogen groups on the pendent aryl rings, were described as inhibitors of lung cancer cell A549 growth, with blocking of K-Ras protein as the identified mechanism [20]. It was reported that 2-bromo-5-(trifluoromethoxy)phenylthiourea, the derivative of quinazoline, suppressed proliferation and migration of human cervical HeLa cells via inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway [21]. Representative 7-trifluoromethyl-quinolinyl-piperazine compounds based on the thiourea scaffold showed improved anti-breast cancer action [22]. In their presence, the membrane integrity of the cytoplasm, mitochondria, and lysosomes of cancer cells were compromised. Series of 4-thiazolidinone-phenylaminopyrimidine hybrids bearing *ortho*-chloro and *para*- CF_3 substituents displayed anticancer activity on chronic myeloid leukemia cells, inducing programmed cell death by inhibition of Abl kinase [23]. Within a group of 1,2,4-triazole-linked (thio)urea conjugates synthesized by Tokala et al., the 4-cyanophenyl derivative with bis(trifluoromethyl)phenyl moiety expressed the highest apoptosis-inducing activity against the breast cancer cell line [24]. The representative diarylurea endowed with both CF_3/OCF_3 substituents has recently been developed as an inhibitor of the most lethal and aggressive subtype of breast cancer [25]. Selective kinase inhibitory agents towards hepatocellular carcinoma cells were found among a series of conformationally restricted fluorinated ureas, analogues of sorafenib [26].

Within the thiourea derivatives, halogenated phenyl-containing heterocyclic thioureas play important roles as anticancer agents against solid tumors, such as derivatives of 1,3,4-thiadiazine [27], dihydroquinoline [28], pyridine [29], piperidine [30], quinazoline [31,32], or thiazole [33]. Their mechanisms of action include inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2 [27], epidermal growth factor receptor kinase [31,32], or acetylcholinesterase [33]. Similarly, the presence of the nitrophenyl moiety at the thiourea branch is identified to impart promising cytotoxic activity towards various solid tumors, including lung, colorectal [34], prostate, and breast [35] carcinoma, acting via mitogen kinase enzyme (MK-2) inhibition [34].

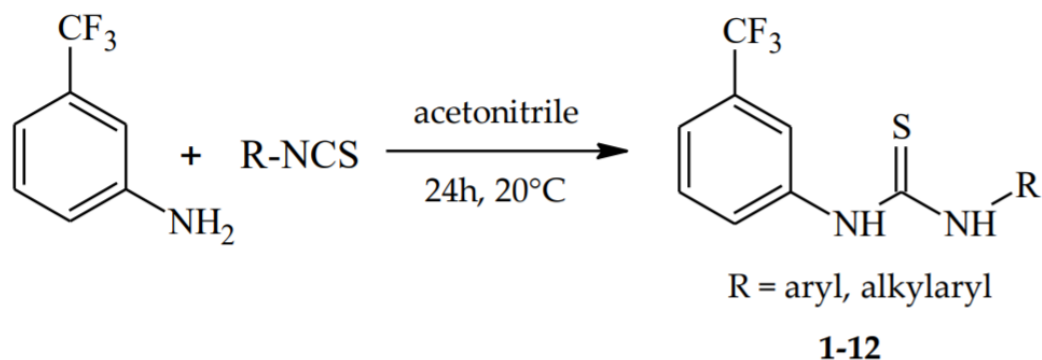
The 3-(Trifluoromethyl)phenylthiourea moiety is a versatile scaffold in medicinal chemistry, also used previously by our team for the design of new compounds with variable and improved pharmacological profiles, mainly antimicrobial [2,8], antiviral [2,12], and CNS-activating [15] compounds. Herein, we focus on possible mechanisms of the cytotoxic properties of a series

of 3-(trifluoromethyl)phenylthiourea analogs, incorporating differential electron-withdrawing terminal groups.

2. Results and Discussion

2.1. Chemistry

The final 1,3-disubstituted thioureas **1–12** were synthesized in a single-step reaction of 3-(trifluoromethyl)aniline with various isothiocyanates, belonging to a group of dihalogenophenyl (**1–4**), halogenomethylphenyl (**5, 6**), alkylphenyl (**12**), or monophenyl-substituted (**7–11**) derivatives (Scheme 1). The presented selection of the phenyl ring terminal groups allowed an investigation of the impact of the substitution isomerism, as well as the influence of the electron-withdrawing elements attached to the benzene ring on the biological properties within the tested thiourea series. The synthesis of compounds **1, 2, 9, 10**, and **12** was described previously. The structures of the newly synthesized derivatives (**3–8, 11**) were characterized by both ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy and HRMS analysis.



Scheme 1. Synthetic procedure for 3-(trifluoromethyl)phenylthiourea derivatives **1–12**.

2.2. Biological Studies

2.2.1. Cytotoxic Activity

As a first step in assessing their cytotoxic properties, all thioureas of the series were assayed against four human carcinoma cell lines, such as SW480 (primary colon cancer), SW620 (metastatic colon cancer), PC3 (metastatic prostate cancer), and K-562 (chronic myelogenous leukemia), as well as against the normal cell line HaCaT (immortalized human keratinocytes). Table 1 lists the compound concentrations that produced 50% of growth inhibition (IC_{50} , μM), generated by the MTT method [36], in comparison with two commonly used chemotherapeutic agents, doxorubicin and cisplatin.

Dihalogenophenyl derivatives (**1–4**), followed by *para*-substituted thioureas (**8, 9**) were the most active among the series towards all tumor cell lines. They were particularly potent against SW620 cells, which appeared to be the most susceptible among the studied pathological cells. The lowest IC_{50} was achieved by 3,4-dichlorophenylthiourea (**2**) and equaled $1.5 \pm 0.72 \mu\text{M}$. Its isomer **3**, and also derivatives of 4-(trifluoromethyl)phenylthiourea (**8**) and 4-chlorophenylthiourea (**9**), inhibited the growth of metastatic colon cancer cells at concentrations ranging from 5.8 ± 0.76 to $7.6 \pm 1.75 \mu\text{M}$. The 3-chloro-4-fluorophenylthiourea (**1**) filled up the group of the most outstanding cytotoxic agents towards the SW620 cell line ($\text{IC}_{50} = 9.4 \pm 1.85 \mu\text{M}$). Moderate anticancer potency at the level of $14.0\text{--}18.7 \mu\text{M}$ was observed for derivatives **4, 10**, and **11**. Importantly, the strongest inhibitors of the growth of these cells (**1–4, 8, 9**) were also described by high selectivity indexes (SIs), ranging from 4.6 (compound **1**) to 16.5 (compound **2**). In addition, when compared to cisplatin, substances **2, 3**, and **9** were found to be more effective, considering both their IC_{50} values and selectivity factors. The potency of compound **2** was up to 4.5 times stronger and its SI 18 times higher than the reference metalodrug.

Table 1. Cytotoxic activity (IC₅₀, µM) of the studied compounds estimated by the MTT assay ^a.

Compound	R	Cancer Cells						Normal Cells		
		SW480 ^d	SI ^c	SW620 ^e	SI	PC3 ^f	SI	K562 ^g	SI	HaCaT ^h
		IC ₅₀ ^b		IC ₅₀		IC ₅₀		IC ₅₀		IC ₅₀
1	3-Cl,4-F-Ph	12.7 ± 1.53	3.4	9.4 ± 1.85	4.6	53.6 ± 2.94	0.8	6.8 ± 1.57	6.4	43.6 ± 4.22
2	3-Cl,4-Cl-Ph	9.0 ± 1.42	2.7	1.5 ± 0.72	16.5	31.7 ± 2.07	0.8	6.3 ± 1.28	3.9	24.7 ± 0.05
3	2-Cl,4-Cl-Ph	30.1 ± 3.11	1.7	5.8 ± 0.76	9.0	13.7 ± 7.04	3.8	54.3 ± 1.86	1.0	52.1 ± 0.95
4	2-Cl,3-Cl-Ph	22.5 ± 0.10	0.6	14.0 ± 1.73	1.0	10.5 ± 2.52	1.3	35.9 ± 0.07	0.4	13.9 ± 1.70
5	2-CH ₃ ,3-Cl-Ph	7.3 ± 0.89	7.6	23.2 ± 4.07	2.4	51.8 ± 3.19	1.1	52.5 ± 2.14	1.1	55.6 ± 1.74
6	2-CH ₃ ,5-Cl-Ph	15.6 ± 4.10	0.9	22.1 ± 4.36	0.7	65.9 ± 10.50	0.2	40.3 ± 3.88	0.4	14.5 ± 1.08
7	2-CF ₃ -Ph	>100	0.7	30.1 ± 9.74	2.2	17.1 ± 0.57	3.8	76.5 ± 4.57	0.9	65.7 ± 3.83
8	4-CF ₃ -Ph	8.9 ± 1.14	4.6	7.6 ± 1.75	5.4	6.9 ± 1.64	6.0	54.8 ± 0.24	0.8	41.3 ± 0.17
9	4-Cl-Ph	38.1 ± 4.38	1.9	6.7 ± 1.74	10.7	22.6 ± 1.25	3.2	10.2 ± 0.35	7.4	71.5 ± 3.08
10	4-CN-Ph	20.6 ± 3.59	2.4	18.7 ± 5.92	2.7	66.2 ± 4.47	0.8	12.9 ± 4.33	3.9	50.1 ± 4.89
11	4-Br-Ph	41.5 ± 4.46	0.4	16.2 ± 4.08	1.1	76.6 ± 4.70	0.2	74.2 ± 6.82	0.2	17.2 ± 0.64
12	-CH ₂ CH ₂ -Ph	25.3 ± 8.53	2.2	38.2 ± 3.10	1.5	26.7 ± 3.95	2.1	23.8 ± 0.45	2.3	55.4 ± 1.08
Doxorubicin ⁱ	-	0.8 ± 0.10	0.4	0.3 ± 0.08	1.0	0.3 ± 0.12	1.0	0.2 ± 0.10	1.5	0.3 ± 0.11
Cisplatin ^j	-	10.4 ± 0.90	0.6	6.7 ± 1.10	0.9	13.2 ± 2.10	0.5	8.2 ± 4.08	0.8	6.3 ± 0.70

^a Data are expressed as mean SD, ^b IC₅₀ (µM)—the concentration of the compound that corresponds to 50% growth inhibition of the cell line (as compared to the control) after cells were cultured for 72 h with the individual compound. ^c The SI (Selectivity Index) was calculated using the formula: SI = IC₅₀ for the normal cell line/IC₅₀ cancer cell line. ^d Human primary colon cancer (SW480), ^e Human metastatic colon cancer (SW620), ^f Human metastatic prostate cancer (PC3), ^g Human chronic myelogenous leukemia (K562), ^h Human immortal keratinocyte cell line from adult human skin (HaCaT). ^{i,j} The reference compounds.

The disubstituted chlorine-containing derivatives **2** and **5**, as well as 4-(trifluoromethyl)-phenyl compound (**8**), applied at concentrations of 7.3–9.0 µM were able to effectively inhibit primary SW480 cell lines, while also being more potent than cisplatin. Additionally, within all compounds, the thiourea **5** was highly selective against SW480 cells vs. the other pathological lines tested. On the other hand, the selectivity of both thioureas towards HaCaT cells was advantageous, extending between 2.7 and 7.6. Moreover, the values of IC₅₀ of their close structural analogs, **1** and **6**, ranged from 12.7 ± 1.53 to 15.6 ± 4.10 µM.

A significant cytotoxic effect on the erythroleukemic K-562 cell lines was observed for dihalogenophenylthioureas **1** and **2**, as well as for the monosubstituted derivative **9**, with all of them containing at least one chlorine atom attached to the terminal ring. Analogs **1** and **2** were 20–30% more effective and several-fold more selective than the reference drug cisplatin. The antiproliferative potency of the *para*-substituted derivatives **9** and **10** was estimated at IC₅₀ of 10.2–12.9 µM.

Prostate cancer cells belonged in the group that were the least vulnerable to the presence of thiourea compounds; however, three halogenated analogs still exerted higher than (compounds **4**, **8**) or comparable (derivative **3**) activity to cisplatin. Their concentrations corresponding to 50% growth inhibition of the PC3 line varied from 6.9 ± 1.64 to 13.7 ± 7.04 µM, and their selectivity indexes were also favorable (1.3–6.0). The most potent 4-(trifluoromethyl)phenylthiourea (**8**) was also strongly effective against both colon cancer lines but not K-562 cells.

The cytotoxic action of the 2-phenylethylthiourea derivative **12** against cancer cells differed from 23.8 ± 0.45 to 38.2 ± 3.10 µM, depending on the tumor line tested, and it was the only inefficient compound of the designed series. It is worth mentioning that generally the lower the IC₅₀ values assigned, the higher the SI found. The most promising drug candidates (**1–4**, **8**, **9**) were weakly cytotoxic towards normal HaCaT cell lines. While none of the tested compounds were as potent as ciprofloxacin, the most effective of them expressed a better cytotoxic profile than cisplatin, and possessed higher selectivity indexes in comparison with both referential chemotherapeutics.

A wide selection of the character, location, and number of phenyl ring substituents of the thiourea branch allowed investigation of the influence of the structure of the studied compounds on their antitumor activity. According to our studies, the terminal benzene moiety functionalities were arranged with their increasing impact on cytotoxicity as follows: 4-bromo- (**11**) < 2-(trifluoromethyl)- (**7**) < 2-methyl-5-chloro- (**6**) < 4-cyano- (**10**) < 2-methyl-3-chloro- (**5**) < 2,3-dichloro- (**4**) < 2,4-dichloro- (**3**) < 4-chloro- (**9**) < 3-chloro-4-fluoro- (**1**) < 4-(trifluoromethyl)- (**8**) < 3,4-dichloro- (**2**). As shown, the most pronounced cytotoxic effect was associated with an incorporation of two halogen atoms in the benzene ring, whereby chlorine (**2**, **3**) or fluorine (**1**) were in the *para*- position. Considering the active monosubstituted derivatives, this position of the phenyl moiety was favored by the trifluoromethyl group (**8**) or chlorine (**9**). The replacement chlorine with fluorine is less beneficial in the case of disubstituted derivatives (**2** → **1**) and heavily unfavorable in a group of monosubstituted thioureas (**9** → **11**). Similarly, the noticeable decrease in bioactivity was observed when the electron-donating methyl group was introduced instead of the second halogen (**5**, **6**). Furthermore, from the closest mutual arrangement of both methyl and chlorine groups with the highest activity, the thiourea **5** is more effective against SW480 and selective towards HaCaT cells than its isomer **6**. Considering other isomers of the substituent position, the most cytotoxic profile was exerted by compound **2** with the 3,4-dichlorophenyl fragment. The change of substituent locations to carbons 2,4 or 2,3 (derivatives **3** and **4**, respectively) led to a gradual reduction in their biological potency. By analogy, the replacement of the *ortho*-substituted CF₃ group (**7**) for the *para* (**8**) position was much more fruitful. While an exchange of this voluminous substituent for chlorine (**8** → **9**) still gave a strongly active analog, switching it into the cyano (**10**) or bromo (**11**) group considerably diminished the antitumor effect. Finally, the introduction of the unsubstituted alkylphenyl group (**12**) to the thiourea branch dramatically decreased the compound's bioactivity.

The most potent derivatives (**1–3**, **8**, **9**) were selected for further investigations of their mechanisms of cytotoxic action.

2.2.2. Antiproliferative Activity

In order to estimate the tumor and normal cell population density and their viability after treatment with compounds **1–3**, **8**, and **9**, the trypan blue dye exclusion assay was performed. The live cell number of all cancerous cells incubated for 72 h with the studied thioureas was considerably lower in comparison with the controls (Table 2; Figure S1A). The highest reduction in cell amount was denoted for both colon SW480 and SW620 cells treated with the dichlorophenyl derivative **2**, and it accounted for 93%. This compound also considerably reduced the PC3 and K-562 cell number by 69% and 66%, respectively. Similarly, a noticeable decline in both colon cancer cell populations was observed after treatment with the *ortho*-substituted compound **8**. The number of live cells equaled 12% and 18%, respectively, as compared to controls. This thiourea also led to a reduction of PC3 cells of 38%, and leukemia K-562 cell lines of 27%. The number of SW620 and PC3 cells decreased by 72% and 63% in the presence of *para*-substituted compound **9**. However, the reducing influence of this thiourea on the number of other cancerous cells was at the level of 21–32%. It is worth noting that the amount of PC3 cells also diminished to 24% compared to the control after long-term exposure to the IC₅₀ concentration of dihalogenophenyl derivative **1**. A significant effect on the other studied pathological cells was also noticed and accounted for 32–46%. Furthermore, the derivative **3** reduced the amount of live cancer cells by 32–59%, of which its decreasing impact on colon cancer cells was the greatest. The obtained results show that thioureas **1–3**, **8**, and **9** exerted a cytostatic effect on cancer cells, suppressing their growth and proliferation.

Table 2. Trypan blue assay. The effect of compounds **1**, **2**, **3**, **8**, and **9** on the live cell number and viability (%) in SW480, SW620, PC3, K-562, and HaCaT cells. Cells were incubated for 72 h with the tested compounds used in their IC₅₀ concentrations, then cells were harvested, stained with trypan blue, and analyzed using a cell counter. Data are expressed as the mean $\pm$ SD.- “control without compound”, ^a Human primary colon cancer (SW480), ^b Human metastatic colon cancer (SW620), ^c Human metastatic prostate cancer (PC3), ^d Human chronic myelogenous leukemia (K562), ^e Human immortal keratinocyte cell line from adult human skin (HaCaT).

		Compound	Cell Number $\times 10^5$	Viability (%)
Cancer cell line	SW480 ^a	-	3.6 $\pm$ 0.20	93 $\pm$ 1.35
		1	2.0 $\pm$ 0.30	69 $\pm$ 1.30
		2	0.3 $\pm$ 0.35	45 $\pm$ 2.40
		3	1.5 $\pm$ 0.10	90 $\pm$ 1.30
		8	0.4 $\pm$ 0.15	90 $\pm$ 2.30
		9	2.5 $\pm$ 0.12	72 $\pm$ 2.25
	SW620 ^b	-	5.7 $\pm$ 0.10	96 $\pm$ 3.30
		1	1.3 $\pm$ 0.25	79 $\pm$ 1.30
		2	0.4 $\pm$ 0.22	42 $\pm$ 1.30
		3	2.4 $\pm$ 0.20	93 $\pm$ 2.33
		8	1.0 $\pm$ 0.20	55 $\pm$ 1.11
		9	1.6 $\pm$ 0.11	84 $\pm$ 3.08
	PC3 ^c	-	3.4 $\pm$ 0.25	97 $\pm$ 2.30
		1	2.3 $\pm$ 0.15	93 $\pm$ 1.50
		2	2.4 $\pm$ 0.16	93 $\pm$ 1.40
		3	1.8 $\pm$ 0.18	58 $\pm$ 1.20
		8	2.1 $\pm$ 0.12	82 $\pm$ 1.10
		9	1.2 $\pm$ 0.15	73 $\pm$ 1.99
	K-562 ^d	-	4.4 $\pm$ 0.15	98 $\pm$ 1.30
		1	1.8 $\pm$ 0.24	93 $\pm$ 2.05
		2	1.0 $\pm$ 0.21	55 $\pm$ 1.03
		3	3.0 $\pm$ 0.27	85 $\pm$ 1.20
		8	3.2 $\pm$ 0.14	88 $\pm$ 1.10
		9	3.5 $\pm$ 0.22	90 $\pm$ 2.40
Normal cell line	HaCaT ^e	-	9.2 $\pm$ 0.25	98 $\pm$ 1.30
		1	6.5 $\pm$ 0.15	97 $\pm$ 1.33
		2	1.6 $\pm$ 0.31	84 $\pm$ 1.03
		3	7.8 $\pm$ 0.14	96 $\pm$ 3.01
		8	4.9 $\pm$ 0.28	98 $\pm$ 1.02
		9	8.6 $\pm$ 0.12	98 $\pm$ 1.50

In addition, after thiourea treatment, the viability of the majority of pathological cell lines was diminished, which proved not only the cytostatic, but also the cytotoxic influence of the selected derivatives (Table 2; Figure S1B). This effect was clearly observed in both SW480 and SW620 cells for thioureas **1**, **2**, and **9**. The largest decrease of cell viability was found for the compound **2** (by 48% and 58%, respectively), while substances **2** and **9** were efficient in 16–24%. Additionally, the derivative **8** reduced the viability of SW620 cells by 45%. Derivatives **2**, **3**, and **9** decreased the survival of PC3 cells by 15–39%, as compared to the control, and the most evident cytotoxic activity in these cells was observed for **3**. The K-562 cell line was the least sensitive to incubation with the evaluated compounds. Its viability was diminished by 10–15% after 72 h of contact with thioureas **2**, **3**, and **8**. Importantly, the various concentrations of the target compounds did not affect normal HaCaT cells' viability.

2.2.3. Apoptotic Activity

To estimate the mechanism of anticancer activity of the selected compounds **1–3**, **8**, and **9**, their effect on both early and late apoptosis was evaluated by flow cytometry analysis. As shown in Figures 2–4, the studied derivatives applied in their IC₅₀ concentrations induced considerably late apoptosis or necrosis in cancerous cells compared to controls. The

apoptosis-activating effect was the strongest in the SW480, SW620, and K-562 cell lines, and the most noticeable activity was observed for the thiourea **2**, followed by its analogs **1** and **8**. Dichlorophenyl derivative **2** and fluorinated thiourea **8** showed a very high percentage of SW480 cells in late apoptosis (95% $\pm$ 1.5% and 97% $\pm$ 1.2%, respectively). Other tested substances also significantly influenced primary colon cancer cells, causing 24% $\pm$ 0.4% (compound **9**) to 60% $\pm$ 1.8% (compound **1**) of SW480 cells to be in late apoptosis. The derivative **2** was similarly the most potent activator of apoptosis in metastatic SW620 cells (99% $\pm$ 0.5%), in comparison with the thiourea **1** (57% $\pm$ 1.2%). The pro-apoptotic impact of derivatives **3**, **8**, and **9** in these cells was not so spectacular and did not exceed 26%. On the other hand, thiourea-derived compounds **1** and **2** considerably affected the level of late apoptosis in leukemia K-562 cells, and gave comparable results (74% $\pm$ 3.8% and 73% $\pm$ 2.0%, respectively). Additionally, visible late apoptosis-inducing properties in these cell lines were denoted for the compound **9** (47% $\pm$ 3.0%), which was twice as strong towards the colon tumor cells mentioned above. The apoptotic properties of analogs **3** and **8** in K-562 cells varied from 30% $\pm$ 1.6% to 33% $\pm$ 2.3%. In contrary, treatment of PC3 cells with thiourea derivatives did not increase their apoptosis, except for the compound **8** (25% $\pm$ 1.5%). The analysis performed in HaCaT cells, incubated with the studied substances **1**, **8**, and **9**, revealed the low level of cells in late apoptosis, counted from 11% to 14%. Whereas the apoptosis-generating influence of derivatives **2** and **3** on normal keratinocytes was higher (29% and 23%), their selectivity measured by MTT methods is favorable. The obtained results are in agreement with the IC₅₀ values assigned to pathological cancer cell lines.

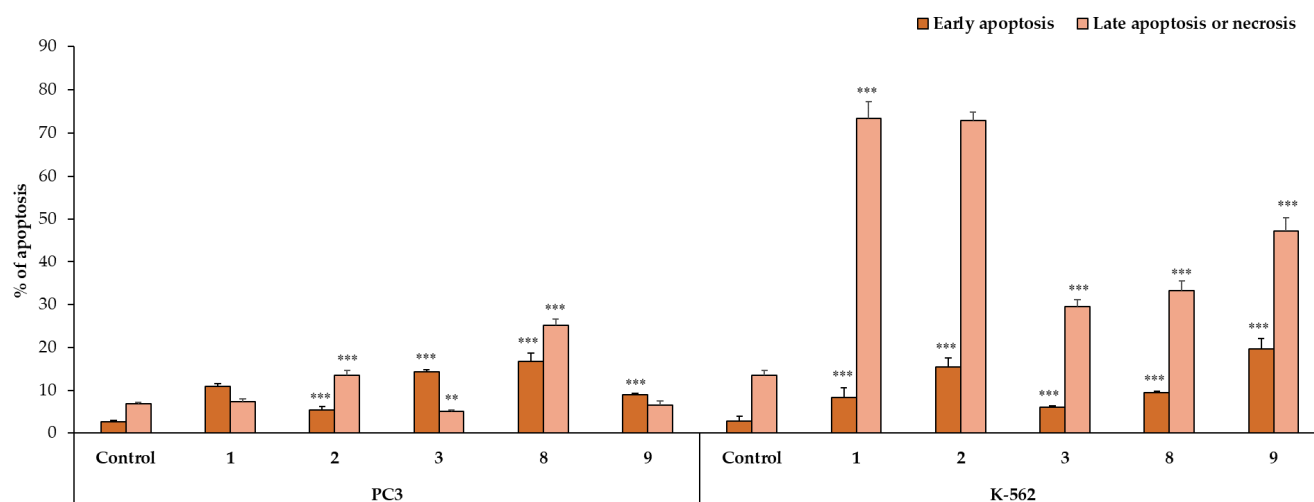


Figure 2. The effect of compounds **1–3**, **8**, and **9** on early and late apoptosis in SW480, SW620, and HaCaT cells. Cells were incubated for 72 h with the tested compounds used in their IC₅₀ concentrations, then cells were harvested, stained with Annexin V-FITC and PI, and analyzed using flow cytometry. Data are expressed as % of cells in the early stage of apoptosis, and as % of cells in the late stage of apoptosis or necrosis. Data are expressed as the mean $\pm$ SD. *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, as compared to the control.

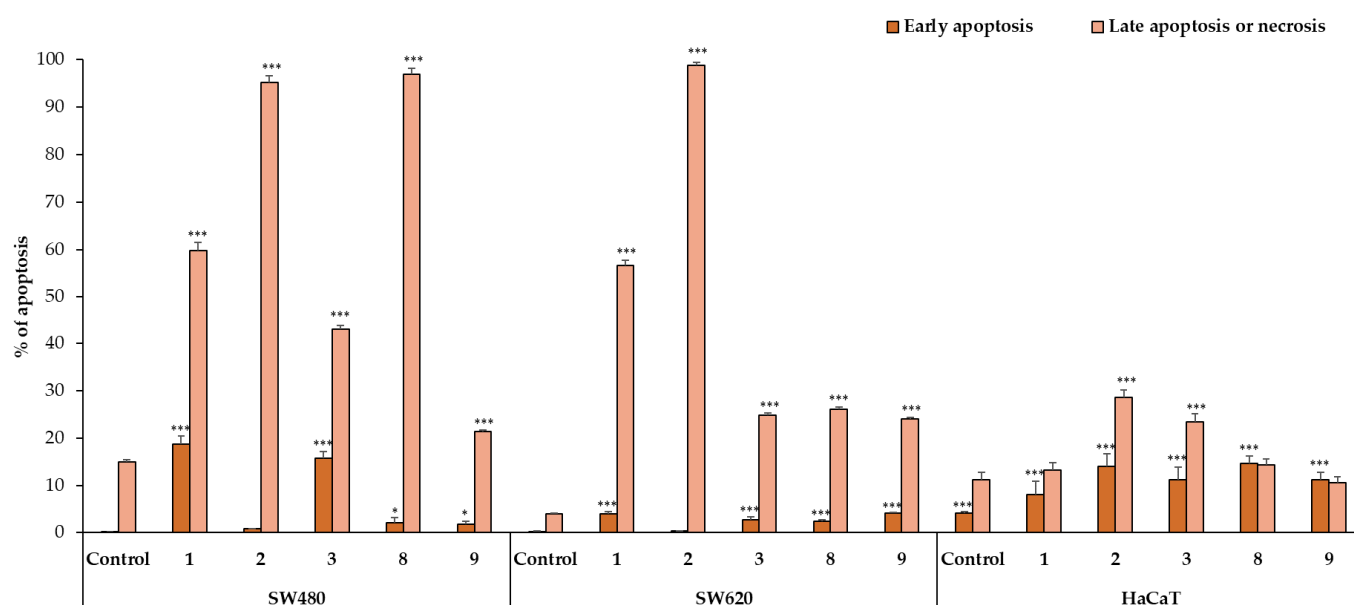


Figure 3. The effect of compounds 1–3, 8, and 9 on early and late apoptosis in PC3 and K-562 cells. Cells were incubated for 72 h with the tested compounds used in their IC₅₀ concentrations, then cells were harvested, stained with Annexin V-FITC and PI, and analyzed using flow cytometry. Data are expressed as % of cells in the early stage of apoptosis, and as % of cells in the late stage of apoptosis. Data are expressed as the means $\pm$ SD. *** $p \leq 0.001$, * $p \leq 0.05$, as compared to the control.

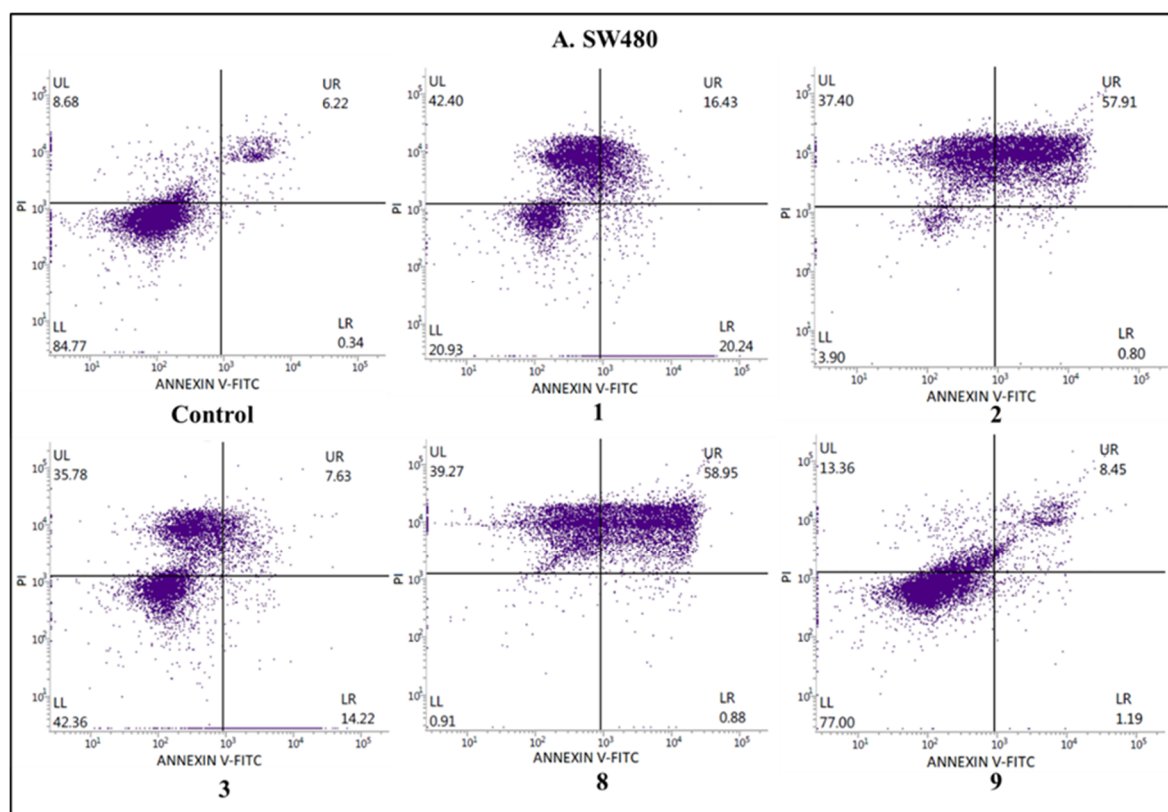


Figure 4. Cont.

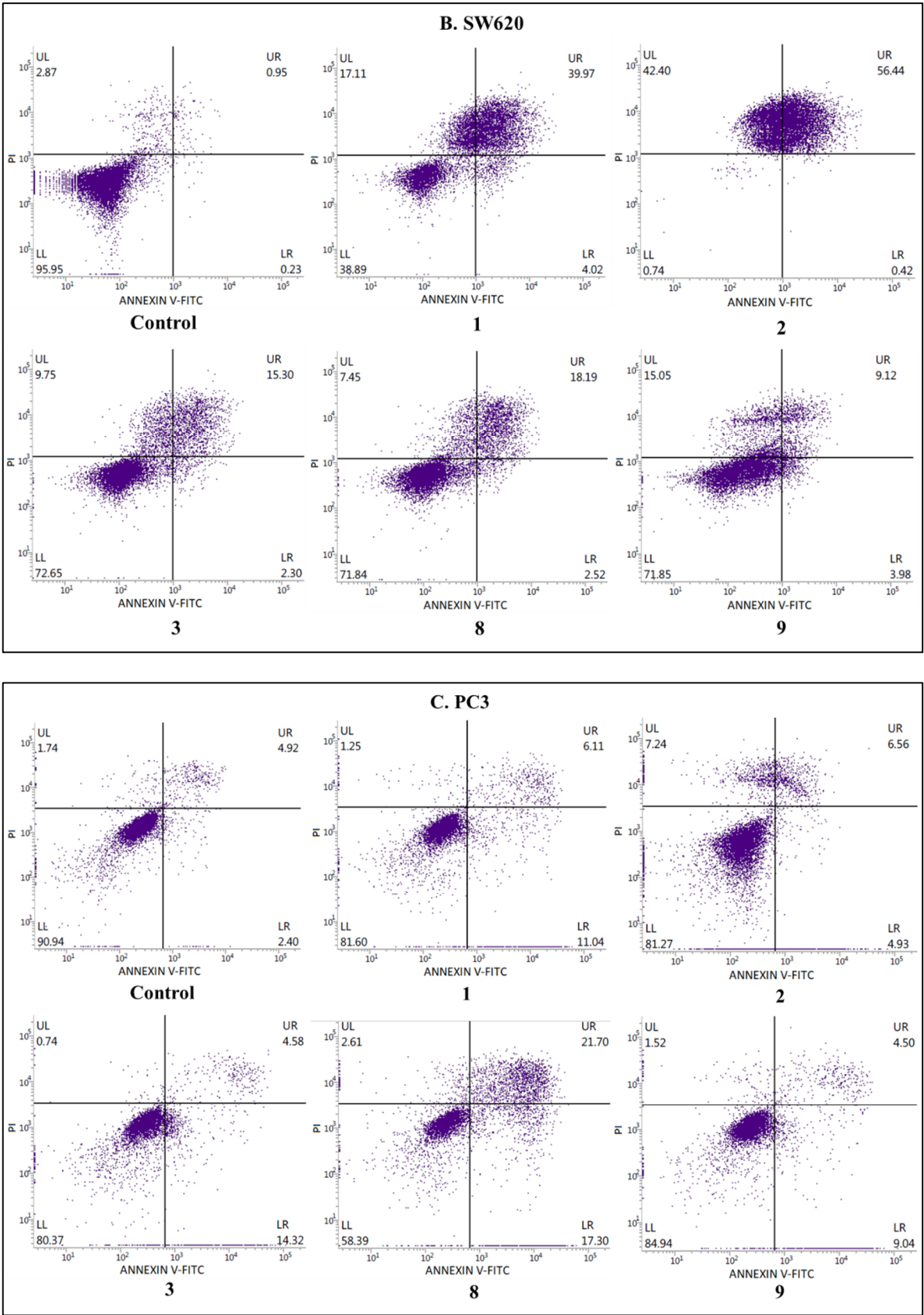


Figure 4. Cont.

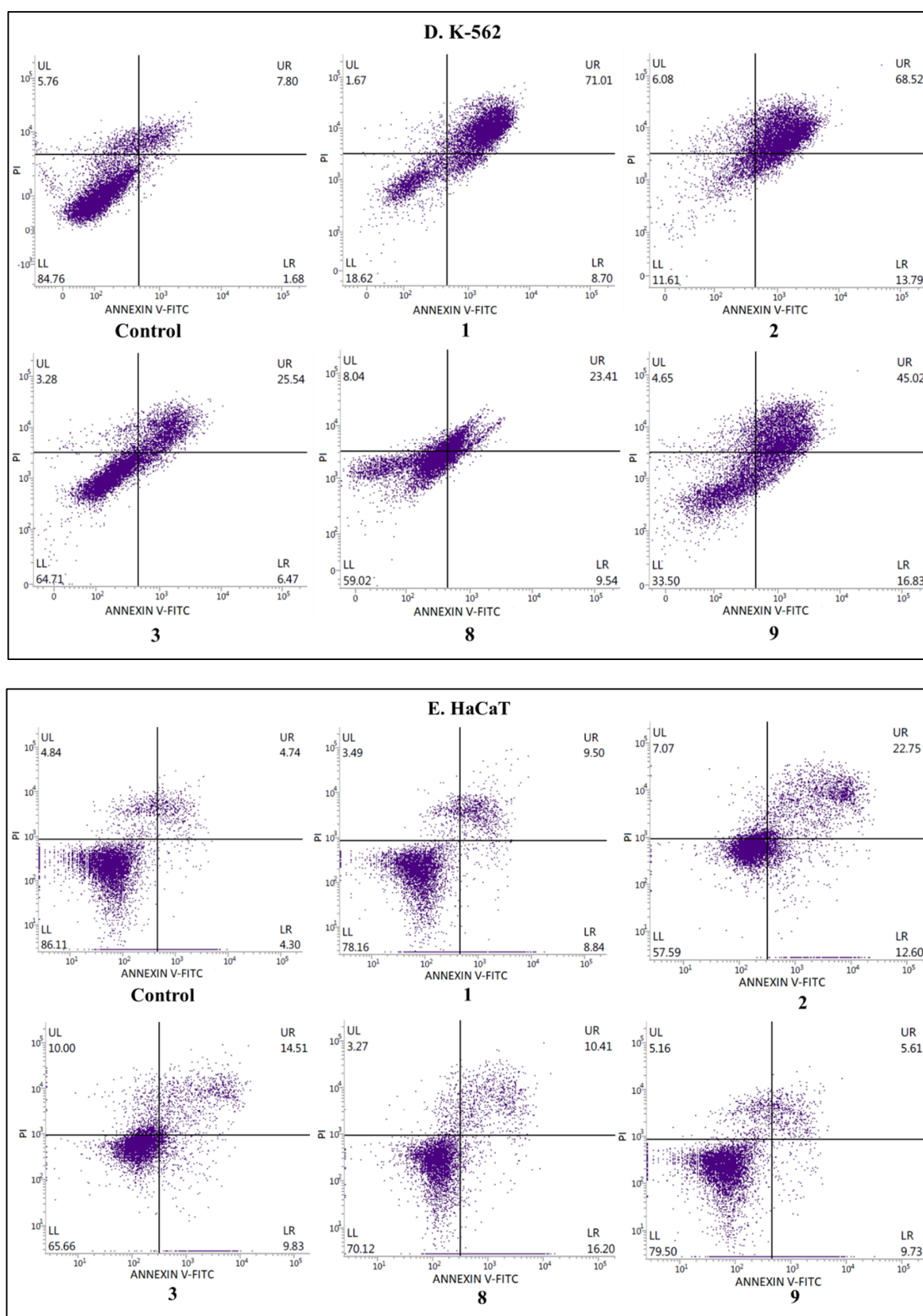


Figure 4. The effects of compounds **1**, **2**, **3**, **8**, and **9** on early and late apoptosis or necrosis in (A) SW480, (B) SW620, (C) PC3, (D) K-562, and (E) HaCaT cells detected with Annexin V-FITC/PI by flow cytometry. Cells were incubated for 72 h with the tested compounds. Dot plot diagrams show representative experiments. The lower left (LL) quadrant represents viable cells and the lower right (LR) quadrant early apoptotic cells. The upper right (UR) quadrant contains late-stage apoptotic cells, and the upper left (UL) quadrant necrotic cells.

2.2.4. Inhibition of IL-6 Release

Interleukin-6 (IL-6) is a cytokine that stimulates the inflammatory and auto-immune processes in many diseases, including pancreatic, prostate, and colon cancers. As its level is higher in advanced and metastatic cancer, IL-6 is also involved in tumor development and progression [37].

Because of the low secretion of IL-6 by leukemic cells compared to solid tumors, and in addition to the lack of IL-6 receptors in K-562 cells [38], studies of the effect of derivatives 1–3, 8, and 9 on the inhibition of IL-6 release were carried out on primary and secondary solid tumor cells (SW480, SW620, and PC3). The results are given in Table 3 and Figure S2. A remarkable inhibition of the IL-6 level was denoted for both colon cancer cell lines. Compound 2, identified as the strongest inhibitor, reduced the interleukin level by 54% (in SW480 cells) and 63% (SW620 cells). A significant effect was also observed in these cells for its structural isomer 3 (39% and 23% of inhibition, respectively). Additionally, compound 3 considerably affected the IL-6 level produced by PC3 cells, and reduced it by 33%. Similarly, the treatment with derivative 1 was effective for both colon cancer cells. In its presence, IL-6 release decreased by 28–36%, as compared to controls. For monosubstituted derivatives 8 and 9, the observed IL-6-reducing influence was weaker. They both inhibited IL-6 secretion in SW480 and SW620 cell lines by 25–32%. In contrast to compound 9, thiourea 8 additionally diminished the cytokine level in PC3 cells by 26%.

Table 3. Effects of compounds 1–3, 8, and 9 on IL-6 levels, measured by the ELISA test. Data are expressed as the mean $\pm$ SD from ^a Human primary colon cancer (SW480), ^b Human metastatic colon cancer (SW620), ^c Human metastatic prostate cancer (PC3), ^d Human immortal keratinocyte cell line from adult human skin (HaCaT).

		Compound	IL-6 Concentration (pg/mL)
Cancer cell line	SW480 ^a	Control	7.8 $\pm$ 0.03
		1	5.7 $\pm$ 0.01
		2	3.6 $\pm$ 0.02
		3	4.8 $\pm$ 0.04
		8	5.3 $\pm$ 0.01
		9	5.5 $\pm$ 0.02
	SW620 ^b	Control	7.7 $\pm$ 0.05
		1	4.9 $\pm$ 0.01
		2	2.8 $\pm$ 0.03
		3	5.9 $\pm$ 0.03
		8	5.8 $\pm$ 0.06
		9	5.2 $\pm$ 0.03
	PC3 ^c	Control	10.9 $\pm$ 0.07
		1	9.6 $\pm$ 0.02
		2	9.1 $\pm$ 0.04
		3	7.3 $\pm$ 0.06
		8	8.1 $\pm$ 0.08
		9	9.9 $\pm$ 0.03
Normal cell line	HaCaT ^d	Control	9.7 $\pm$ 0.03
		1	8.7 $\pm$ 0.03
		2	9.1 $\pm$ 0.03
		3	8.9 $\pm$ 0.01
		8	9.1 $\pm$ 0.06
		9	9.0 $\pm$ 0.01

3. Materials and Methods

3.1. Chemistry

3.1.1. General Procedure

(Trifluoromethyl)aniline was supplied by Alfa Aesar (Stock No. A15910). Isothiocyanates were purchased from Alfa Aesar or Sigma Aldrich. Acetonitrile, chloroform, and

methanol were supplied by POCh (Polskie Odczynniki Chemiczne). All chemicals were of analytical grade and were used without any further purification. Prior to usage, acetonitrile was kept in crown cap bottles over anhydrous phosphorus pentoxide (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). The NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE DMX400 spectrometer, operating at 300 (^1H NMR) and 75.5 MHz (^{13}C NMR). The spectra were measured in DMSO and are given as δ values (in ppm) relative to TMS. Mass spectral ESI measurements were carried out on an LCT Micromass TOF HiRes apparatus. Flash chromatography was performed on Merck silica gel 60 (200–400 mesh) using chloroform:methanol mixture. Analytical TLC was carried out on silica gel F254 (Merck, Darmstadt, Germany) plates (0.25 mm thickness).

General Procedure for the Preparation of N-aryl-[3-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea Derivatives (1–12)

A solution of commercially available 3-(trifluoromethyl)aniline (0.0031 mol, 0.50 g) in anhydrous acetonitrile (5 mL) was treated with appropriate isothiocyanate (0.0031 mol) and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. Then, solvent was removed on a rotary evaporator. The residue was purified by column chromatography (chloroform:methanol; 9.5:0.5 vol.) to yield derivatives 1–12.

1-(3-chloro-4-fluorophenyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea (1) was synthesized as described previously [39].

1-(3,4-dichlorophenyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea (2) was synthesized as described previously [39].

1-(2,4-dichlorophenyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea (3) Yield 70%, cream powder, m.p. 155–157 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 10.22 (s, 1H, NH), 9.73 (s, 1H, NH), 8.00 (s, 1H, Ar-H), 7.80–7.77 (d, 1H, J = 9.0 Hz, Ar-H), 7.71–7.70 (d, 1H, J = 3.0 Hz, Ar-H), 7.62–7.55 (m, 2H, Ar-H), 7.50–7.43 (m, 2H, Ar-H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 180.62, 140.11, 135.34, 131.49, 131.30, 131.07, 129.62, 129.06 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 31.7 Hz), 129.06, 128.43, 127.48, 124.03 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 272.6 Hz), 120.97 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 3.8 Hz), 119.91 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 3.8 Hz). HRMS (ESI) calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{F}_3\text{SCl}_2$ $[\text{M} - \text{H}]^-$: 362.9726, found: 362.9737.

1-(2,3-dichlorophenyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea (4) Yield 65%, white powder, m.p. 140–142 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 10.24 (s, 1H, NH), 9.83 (s, 1H, NH), 7.99 (s, 1H, Ar-H), 7.80–7.77 (d, 1H, J = 9.0 Hz, Ar-H), 7.61–7.53 (m, 3H, Ar-H), 7.50–7.47 (m, 1H, Ar-H), 7.41–7.35 (m, 1H, Ar-H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 180.63, 140.13, 138.17, 131.90, 129.62, 129.32, 129.05 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 31.7 Hz), 128.63, 128.35, 127.88, 127.47, 124.03 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 272.6 Hz), 120.98 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 3.8 Hz), 119.93 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 4.5 Hz). HRMS (ESI) calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{F}_3\text{SCl}_2$ $[\text{M} - \text{H}]^-$: 362.9726, found: 362.9737.

1-(3-chloro-2-methylphenyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea (5) Yield 65%, white powder, m.p. 163–165 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 9.95 (s, 1H, NH), 9.77 (s, 1H, NH), 7.94 (m, 1H, Ar-H), 7.79–7.75 (m, 1H, Ar-H), 7.61–7.44 (m, 2H, Ar-H), 7.41–7.34 (m, 1H, Ar-H), 7.26–7.23 (m, 2H, Ar-H), 2.27 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 180.80, 140.43, 139.07, 133.85, 133.50, 129.44, 129.36 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 31.7 Hz), 128.73, 127.51, 127.23, 127.10, 124.07 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 272.6 Hz), 120.72 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 3.8 Hz), 119.98 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 4.5 Hz), 15.27. HRMS (ESI) calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{F}_3\text{SCl}$ $[\text{M} - \text{H}]^-$: 343.0315, found: 343.0284.

1-(5-chloro-2-methylphenyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea (6) Yield 63%, cream powder, m.p. 146–148 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 10.03 (s, 1H, NH), 9.64 (s, 1H, NH), 7.96–7.93 (m, 1H, Ar-H), 7.79–7.74 (m, 1H, Ar-H), 7.59–7.54 (t, 1H, J = 7.5 Hz, Ar-H), 7.50–7.45 (m, 1H, Ar-H), 7.39–7.38 (d, 1H, J = 3.0 Hz, Ar-H), 7.31–7.28 (m, 1H, Ar-H), 7.26–7.20 (m, 1H, Ar-H), 2.23 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 180.55, 140.34, 138.83, 133.84, 131.85, 129.85, 129.51, 128.99 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 31.7 Hz), 127.52, 126.43, 125.86, 124.10 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 271.8 Hz), 120.75 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 4.5 Hz), 119.95 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 3.8 Hz), 17.29. HRMS (ESI) calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{F}_3\text{SCl}$ $[\text{M} - \text{H}]^-$: 343.0315, found: 343.0284.

1-[2-(trifluoromethyl)phenyl]-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea (7) Yield 72%, white powder, m.p. 173–175 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 10.18 (s, 1H, NH), 9.60 (s, 1H, NH), 8.05 (s, 1H, Ar-H), 7.78–7.68 (m, 3H, Ar-H), 7.60–7.47 (m, 4H, Ar-H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 181.51, 140.17, 136.79, 132.81, 132.33, 129.62, 129.05

(q, J_{C-F} = 31.7 Hz), 128.42, 127.52, 127.26, 126.25 (q, J_{C-F} = 4.5 Hz), 125.85, 125.38, 120.91 (q, J_{C-F} = 3.8 Hz), 119.74 (q, J_{C-F} = 3.8 Hz). HRMS (ESI) calc. for $C_{15}H_9N_2F_6S$ $[M - H]^-$: 363.0368, found: 363.0391.

1-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-3-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea (**8**) Yield 76%, white powder, m.p. 134–136 °C. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 10.36–10.34 (m, 1H, NH), 10.26–10.23 (m, 1H, NH), 7.96–7.93 (m, 1H, Ar-H), 7.79–7.68 (m, 5H, Ar-H), 7.61–7.55 (t, 1H, J = 9.0 Hz, Ar-H), 7.50–7.47 (m, 1H, Ar-H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 179.90, 143.02, 140.14, 129.64, 129.32, 128.48, 127.43, 126.13, 125.73 (q, J_{C-F} = 3.8 Hz), 124.26, 124.27 (q, J_{C-F} = 32.5 Hz), 123.06, 122.38, 120.94 (q, J_{C-F} = 3.8 Hz), 119.91 (q, J_{C-F} = 3.9 Hz). HRMS (ESI) calc. for $C_{15}H_9N_2F_6S$ $[M - H]^-$: 363.0368, found: 363.0391.

1-(4-chlorophenyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea (**9**) was synthesized as described previously [2].

1-(4-cyanophenyl)-3-[3-(trifluoromethyl)-phenyl]thiourea (**10**) was synthesized as described previously [2].

1-(4-bromophenyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea (**11**) Yield 75%, white powder, m.p. 182–184 °C. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 10.09–10.08 (d, 2H, J = 3.0 Hz, NH), 7.94 (s, 1H, Ar-H), 7.77–7.74 (d, 1H, J = 9.0 Hz, Ar-H), 7.59–7.52 (m, 3H, Ar-H), 7.48–7.44 (m, 3H, Ar-H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 179.82, 140.31, 138.52, 131.39, 129.52, 128.6 (q, J_{C-F} = 31.0 Hz), 128.38, 127.36, 125.72, 124.06 (q, J_{C-F} = 272.6 Hz), 120.73 (q, J_{C-F} = 3.8 Hz), 119.85 (q, J_{C-F} = 4.5 Hz), 118.64, 116.81. HRMS (ESI) calc. for $C_{14}H_9N_2F_3SBr$ $[M - H]^-$: 372.9620, found: 372.9622.

1-(2-phenylethyl)-3-[3-(trifluoromethyl)-phenyl]thiourea (**12**) was synthesized as described previously [2].

3.2. Biological Studies

3.2.1. Cell Culture

The human primary (SW480), metastatic (SW620) colon cancer, metastatic prostate cancer (PC3), chronic myelogenous leukemia (K-562), and human immortal keratinocyte (HaCaT) cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). The cells were cultured in medium according to protocols (MEM for SW480 and SW620, RPMI 1640 for PC3 and K-562, and DMEM for HaCaT cells), supplemented with 10% FBS, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 μ g/mL), and cultured in a 37 °C/5% CO_2 humidified incubator. The cells were cultured until appropriate confluence was achieved (80–90%). Next, they were harvested by treatment with 0.25% trypsin (Gibco Life Technologies, Waltham, MA, USA) excluding the non-adherent K-562 cell line and used for studies.

3.2.2. MTT Assay

To determine the IC_{50} of the thiourea compounds **1–12**, cells were seeded in 96-well plates (1×10^4 cells per well) and treated for 72 h with different concentrations of compounds. Cells without the studied compounds in medium were used as a control.

The cell viability was assessed by determination of MTT salt [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] conversion by mitochondrial dehydrogenase. The MTT assay was performed as previously described [37]. Alternatively, non-adherent leukemic cells were centrifuged in a microplate centrifuge ($400 \times g$, 5 min) during the collection stages. Experiments were repeated three times. Cell viability was presented as a percent of MTT reduction in the treated cells versus the control cells. The number of viable cells cultured without the studied compounds was assumed as 100%. A decreased relative MTT level indicated decreased cell viability. Thiourea compounds with the highest cytotoxic potential assessed by MTT determination (with the lowest IC_{50}) were chosen for subsequent assessments of cytotoxicity mechanisms.

3.2.3. Trypan Blue Assay

Cells (1×10^5 cells per well) were seeded in 12-well plates and after 72 h of incubation with IC_{50} concentrations of the studied compounds **1–3**, **8**, and **9**, they were washed twice with PBS (phosphate-buffered saline) and harvested. The live cell count was assessed by the trypan blue exclusion dye assay using an automated cell counter (CountessTM Invitrogen, Waltham, MA, USA). Untreated cells were used as the control.

3.2.4. Annexin V Binding Assay

The cells were cultured and harvested under the conditions described in Section 3.2.1. Then, they were seeded in six-well plates (2×10^5 cells per well), and treated with the selected thioureas **1–3**, **8**, and **9** at their IC_{50} concentration for 72 h. The effect of these compounds on the process of early and late apoptosis and necrosis was determined as described previously [37] by dual staining with Annexin V:FITC and propidium iodide, according to the manufacturer's protocol (Becton Dickinson). The cells that were Annexin V:FITC positive and PI negative were identified as early apoptotic, and Annexin V:FITC and PI positive as late apoptotic or necrotic.

3.2.5. IL-6 Level Assay

The IL-6 concentration in all studied cancer cells and normal HaCaT cell lines was measured by an ELISA kit (Diaclon SAS Besancon CEDEX, Besançon, France). Cells were seeded in 12-well plates (1×10^5 cells per well) and treated with the IC_{50} concentration of the studied compounds **1–3**, **8**, and **9** for 72 h. IL-6 in cell culture supernatant was measured using the enzyme-linked immunosorbent assay in accordance with the manufacturer's protocol.

3.2.6. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9 software (GraphPad Software). The results were expressed as mean $\pm$ SD from at least three independent experiments. The statistical significance of differences between means was established by ANOVA with Dunnett's multiple comparison post hoc test. P values below 0.05 were considered statistically significant.

4. Conclusions

In summary, we herein report a high-throughput synthesis of 3-(trifluoromethyl)aniline with various isothiocyanates. The effect of all the synthesized compounds' inhibition of the growth of human tumor cell lines, such as SW480 (primary colon cancer), SW620 (metastatic colon cancer), PC3 (metastatic prostate cancer), and K-562 (chronic myelogenous leukemia), was evaluated. Dihalogenophenyl (**1–4**) and *para*-substituted thioureas (**8**, **9**) were highly cytotoxic against the mentioned pathological cell cultures ($IC_{50} \leq 10 \mu M$), with selectivity over normal HaCaT cells. Compounds **2**, **3**, and **9** were more effective and selective than the reference cisplatin. The mechanisms of the *in vitro* cytotoxic activity of the most bioactive compounds **1–3**, **8**, and **9** were studied. All of them were cytostatic and reduced the cancer cells' number, being safe for normal keratinocytes. Cytotoxic thioureas **1**, **2**, and **9** considerably diminished the viability of both SW480 and SW620 cells. Derivatives **1**, **2**, and **8** exerted the strongest apoptosis-activating effect in SW480, SW620, and K-562 cell lines. Among them, compound **2** showed the highest percentage of colon cancer cells in late apoptosis. The tested derivatives revealed anti-IL-6 activity and significantly decreased the levels of the proinflammatory cytokine produced by both colon carcinoma cells.

The structural modifications of the thiourea terminal moieties indicated the dihalogenophenyl derivative **2**, followed by its isomer **3** and *para*-substituted analog **8**, as the most effective in cancer treatment. This work constitutes an evaluation of the potential and mechanisms of cytotoxic action of thiourea-derived compounds, which will be developed.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ph14111097/s1>, Figure S1. (A) Trypan blue assay. The effect of compounds **1**, **2**, **3**, **8** and **9** on cell number in SW480, SW620, PC3, K-562 and HaCaT cells. (B) Trypan blue assay. The effect of compounds **1**, **2**, **3**, **8** and **9** on viability in SW480, SW620, PC3, K-562 and HaCaT cells. Figure S2. Effects of compounds **1–3**, **8** and **9** on IL-6 levels, measured by ELISA test. ^1H and ^{13}C NMR spectra of synthesized compounds **3–8**, **11**. Table S1. High Resolution Mass Spectra (HRMS) of compounds **4**, **6**, **7**, **11**.

Author Contributions: Conceptualization, A.B. and A.C.; software, P.S.-Ł.; validation, A.C.; investigation, P.S.-Ł. and K.P.; writing—original draft preparation, A.B.; writing—review and editing, A.C.; visualization, P.S.-Ł. and A.B.; supervision, A.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or supplementary material.

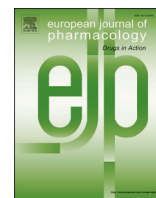
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Frankish, H. 15 Million New Cancer Cases per Year by 2020, Says Who. *Lancet* **2003**, *361*, 1278. [CrossRef]
- Bielenica, A.; Stefańska, J.; Stępień, K.; Napiórkowska, A.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Sanna, G.; Madeddu, S.; Boi, S.; Giliberti, G.; Wrzosek, M.; et al. Synthesis, Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of Thiourea Derivatives Incorporating 3-(Trifluoromethyl)phenyl Moiety. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 111–125. [CrossRef] [PubMed]
- Bielenica, A.; Sanna, G.; Madeddu, S.; Giliberti, G.; Stefańska, J.; Koziół, A.; Savchenko, O.; Strzyga-Łach, P.; Chrzanowska, A.; Kubiak-Tomaszewska, G.; et al. Disubstituted 4-Chloro-3-Nitrophenylthiourea Derivatives: Antimicrobial and Cytotoxic Studies. *Molecules* **2018**, *23*, 2428. [CrossRef] [PubMed]
- Maalik, A.; Rahim, H.; Saleem, M.; Fatima, N.; Rauf, A.; Wadood, A.; Malik, M.I.; Ahmed, A.; Rafique, H.; Zafar, M.N.; et al. Synthesis, Antimicrobial, Antioxidant, Cytotoxic, Antiurease and Molecular Docking Studies of N-(3-Trifluoromethyl)Benzoyl-N'-Aryl Thiourea Derivatives. *Bioorg. Chem.* **2019**, *88*, 102946. [CrossRef]
- Bielenica, A.; Stępień, K.; Napiórkowska, A.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Krukowski, S.; Włodarczyk, M.; Struga, M. Synthesis and Antimicrobial Activity of 4-Chloro-3-Nitrophenylthiourea Derivatives Targeting Bacterial Type II Topoisomerases. *Chem. Biol. Drug Des.* **2016**, *87*, 905–917. [CrossRef]
- Mazzotta, S.; Cebrero-Canguero, T.; Frattaruolo, L.; Vega-Holm, M.; Carretero-Ledesma, M.; Sánchez-Céspedes, J.; Cappello, A.R.; Aiello, F.; Pachón, J.; Vega-Pérez, J.M.; et al. Exploration of Piperazine-Derived Thioureas as Antibacterial and Anti-Inflammatory Agents. In Vitro Evaluation against Clinical Isolates of Colistin-Resistant *Acinetobacter Baumannii*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 127411. [CrossRef]
- Ameryckx, A.; Pochet, L.; Wang, G.; Yildiz, E.; Saadi, B.E.; Wouters, J.; Van Bambeke, F.; Frédérick, R. Pharmacomodulations of the Benzoyl-Thiosemicarbazide Scaffold Reveal Antimicrobial Agents Targeting D-Alanyl-D-Alanine Ligase in Bacteria. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *200*, 112444. [CrossRef]
- Bielenica, A.; Drzewiecka-Antonik, A.; Rejmak, P.; Stefańska, J.; Koliński, M.; Kmiecik, S.; Lesyng, B.; Włodarczyk, M.; Pietrzyk, P.; Struga, M. Synthesis, Structural and Antimicrobial Studies of Type II Topoisomerase-Targeted Copper(II) Complexes of 1,3-Disubstituted Thiourea Ligands. *J. Inorg. Biochem.* **2018**, *182*, 61–70. [CrossRef]
- Bielenica, A.; Sanna, G.; Madeddu, S.; Struga, M.; Jóźwiak, M.; Koziół, A.E.; Sawchenko, A.; Materek, I.B.; Serra, A.; Giliberti, G. New Thiourea and 1,3-Thiazolidin-4-one Derivatives Effective on the HIV-1 Virus. *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, *90*, 883–891. [CrossRef]
- Nagalakshamma, V.; Venkataswamy, M.; Pasala, C.; Umamaheswari, A.; Thyagaraju, K.; Nagaraju, C.; Chalapathi, P.V. Design, Synthesis, Anti-Tobacco Mosaic Viral Aand Molecule Docking Simulations of Urea/Thiourea Derivatives of 2-(Piperazine-1-Yl)-Pyrimidine and 1-(4-Fluoro/4-Chloro Phenyl)-Piperazine and 1-(4-ChloroPhenyl)-Piperazine—A Study. *Bioorg. Chem.* **2020**, *102*, 104084. [CrossRef]
- Khachatoorian, R.; Micewicz, E.D.; Micewicz, A.; French, S.W.; Ruchala, P. Optimization of 1,3-Disubstituted Urea-Based Inhibitors of Zika Virus Infection. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 126626. [CrossRef]
- Bielenica, A.; Szulczyk, D.; Olejarz, W.; Madeddu, S.; Giliberti, G.; Materek, I.B.; Koziół, A.E.; Struga, M. 1H-Tetrazol-5-Amine and 1,3-Thiazolidin-4-one Derivatives Containing 3-(Trifluoromethyl)Phenyl Scaffold: Synthesis, Cytotoxic and Anti-Hiv Studies. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *94*, 804–812. [CrossRef]
- Doğan, Ş.D.; Gündüz, M.G.; Doğan, H.; Krishna, V.S.; Lherbet, C.; Sriram, D. Design and Synthesis of Thiourea-Based Derivatives as Mycobacterium Tuberculosis Growth and Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (InhA) Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *199*, 112402. [CrossRef]

14. Kollu, U.; Avula, V.K.; Vallela, S.; Pasupuleti, V.R.; Zyryanov, G.V.; Neelam, Y.S.; Chamarthi, N.R. Synthesis, Antioxidant Activity and Bioinformatics Studies of L-3-Hydroxytyrosine Templated N-Alkyl/ Aryl Substituted Urea/Thioureas. *Bioorg. Chem.* **2021**, *111*, 104837. [\[CrossRef\]](#)
15. Bielenica, A.; Kędzierska, E.; Koliński, M.; Kmiecik, S.; Koliński, A.; Fiorino, F.; Severino, B.; Magli, E.; Corvino, A.; Rossi, I.; et al. 5-HT₂ receptor affinity, docking Studies and Pharmacological Evaluation of a Series of 1,3-Disubstituted Thiourea Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *116*, 173–186. [\[CrossRef\]](#)
16. Kaymakçioğlu, B.K.; Rollas, S.; Körçegez, E.; Arıcıoğlu, F. Synthesis and Biological Evaluation of New N-Substituted-N'-(3,5-Di/1,3,5-Trimethylpyrazole-4-yl)Thiourea/Urea Derivatives. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *26*, 97–103. [\[CrossRef\]](#)
17. Stefanska, J.; Szulczyk, D.; Koziol, A.E.; Mirosław, B.; Kedzierska, E.; Fidecka, S.; Busonera, B.; Sanna, G.; Giliberti, G.; La Colla, P.; et al. Disubstituted Thiourea Derivatives and Their Activity on CNS: Synthesis and Biological Evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 205–213. [\[CrossRef\]](#)
18. Bielenica, A.; Kedzierska, E.; Fidecka, S.; Maluszynska, H.; Mirosław, B.; Koziol, A.E.; Stefanska, J.; Madeddu, S.; Giliberti, G.; Sanna, G.; et al. Synthesis, Antimicrobial and Pharmacological Evaluation of Thiourea Derivatives of 4H-1,2,4-Triazole. *Lett. Drug Discov. Dev.* **2015**, *12*, 263–276. [\[CrossRef\]](#)
19. Nammalwar, B.; Bunce, R.A.; Berlin, K.D.; Benbrook, D.M.; Toal, C. Synthesis and Biological Evaluation of Sheta2 (NSC-721689) Analogs against the Ovarian Cancer Cell Line a2780. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *170*, 16–27. [\[CrossRef\]](#)
20. Zhang, Y.; Meng, X.; Tang, H.; Cheng, M.; Yang, F.; Xu, W. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Substituted Thiourea Derivatives as Potential Anticancer Agents for NSCLC by Blocking k-Ras Protein-Effectors Interactions. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2019**, *35*, 344–353. [\[CrossRef\]](#)
21. Dai, B.; Yang, T.; Shi, X.; Ma, N.; Kang, Y.; Zhang, J.; Zhang, Y. HMQ-T-F5 (1-(4-(2-Aminoquinazolin-7-yl)Phenyl)-3-(2-Bromo-5-(Trifluoromethoxy)Phenyl) Thiourea) Suppress Proliferation and Migration of Human Cervical HeLa Cells *via* Inhibiting Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Phytomedicine* **2018**, *51*, 48–57. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Viswas, R.S.; Pundir, S.; Lee, H. Design and Synthesis of 4-Piperazinyl Quinoline Derived Urea/Thioureas for Anti-Breast Cancer Activity by a Hybrid Pharmacophore Approach. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2019**, *34*, 620–630. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Türe, A.; Ergül, M.; Ergül, M.; Altun, A.; Küçükgülzel, İ. Design, Synthesis, and Anticancer Activity of Novel 4-Thiazolidinone-Phenylaminopyrimidine Hybrids. *Mol. Divers.* **2020**, *25*, 1025–1050. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Tokala, R.; Bale, S.; Janrao, I.P.; Vennela, A.; Kumar, N.P.; Senwar, K.R.; Godugu, C.; Shankaraiah, N. Synthesis of 1,2,4-Triazole-Linked Urea/Thiourea Conjugates as Cytotoxic and Apoptosis Inducing Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 1919–1924. [\[CrossRef\]](#)
25. Johnson, J.; Rychahou, P.; Sviripa, V.M.; Weiss, H.L.; Liu, C.; Watt, D.S.; Evers, B.M. Induction of AMPK Activation By N,N'-Diarylurea FND-4b Decreases Growth and Increases Apoptosis in Triple Negative and Estrogen-Receptor Positive Breast Cancers. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0209392. [\[CrossRef\]](#)
26. Sbenati, R.M.; Zareai, S.-O.; El-Gamal, M.I.; Anbar, H.S.; Tarazi, H.; Zoghbor, M.M.; Mohamood, N.A.; Khakpour, M.M.; Zaher, D.M.; Omar, H.A.; et al. Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Modeling Studies of Novel Conformationally-Restricted Analogues of Sorafenib as Selective Kinase-Inhibitory Antiproliferative Agents against Hepatocellular Carcinoma Cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *210*, 113081. [\[CrossRef\]](#)
27. Ragab, F.A.F.; Abdel-Aziz, S.A.; Kamel, M.; Ouf, A.M.; Allam, H.A. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Some New 1,3,4-Thiadiazine-Thiourea Derivatives as Potential Antitumor Agents against Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Bioorg. Chem.* **2019**, *93*, 103323. [\[CrossRef\]](#)
28. Farooqi, S.I.; Arshad, N.; Perveen, F.; Channar, P.A.; Saeed, A.; Javed, A. Corrigendum to “Aroylthiourea Derivatives of Ciprofloxacin Drug as DNA Binder: Theoretical, Spectroscopic and Electrochemical Studies along with Cytotoxicity Assessment”. *Arch. Biochem. Biophys.* **2020**, *686*, 108268. [\[CrossRef\]](#)
29. Elseginy, S.A.; Hamdy, R.; Menon, V.; Almhedi, A.M.; El-Awady, R.; Soliman, S.S.M. Design, Synthesis, and Computational Validation of Novel Compounds Selectively Targeting Her2-Expressing Breast Cancer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 127658. [\[CrossRef\]](#)
30. Ghorab, M.M.; Alsaid, M.S.; El-Gaby, M.S.A.; Safwat, N.A.; Elaasser, M.M.; Soliman, A.M. Biological Evaluation of Some New N-(2,6-Dimethoxypyrimidinyl) Thioureido Benzenesulfonamide Derivatives as Potential Antimicrobial and Anticancer Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *124*, 299–310. [\[CrossRef\]](#)
31. Mowafy, S.; Galanis, A.; Doctor, Z.M.; Paranal, R.M.; Lasheen, D.S.; Farag, N.A.; Jänne, P.A.; Abouzid, K.A.M. Toward Discovery of Mutant EGFR Inhibitors; Design, Synthesis and in Vitro Biological Evaluation of Potent 4-Arylamino-6-Ureido and Thioureido-Quinazoline Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 3501–3512. [\[CrossRef\]](#)
32. Hamed, M.M.; Darwish, S.S.; Herrmann, J.; Abadi, A.H.; Engel, M. First Bispecific Inhibitors of the Epidermal Growth Factor Receptor Kinase and the Nf-Kb Activity as Novel Anticancer Agents. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 2853–2868. [\[CrossRef\]](#)
33. Turan-Zitouni, G.; Altıntop, M.D.; Özdemir, A.; Kaplancıklı, Z.A.; Çiftçi, G.A.; Temel, H.E. Synthesis and Evaluation of Bis-Thiazole Derivatives as New Anticancer Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *107*, 288–294. [\[CrossRef\]](#)
34. Ghorab, M.M.; Alsaid, M.S.; Al-Dosary, M.S.; Nissan, Y.M.; Attia, S.M. Design, Synthesis and Anticancer Activity of Some Novel Thioureido-Benzenesulfonamides Incorporated Biologically Active Moieties. *Chem. Cent. J.* **2016**, *10*, 19. [\[CrossRef\]](#)
35. Liu, S.; Louie, M.C.; Rajagopalan, V.; Zhou, G.; Ponce, E.; Nguyen, T.; Green, L. Synthesis and Evaluation of the Diarylthiourea Analogs as Novel Anti-Cancer Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 1301–1305. [\[CrossRef\]](#)

-
36. Sylvester, P.W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *716*, 157–168. [[CrossRef](#)]
 37. Chrzanowska, A.; Roszkowski, P.; Bielenica, A.; Olejarz, W.; Stępień, K.; Struga, M. Anticancer and Antimicrobial Effects of Novel Ciprofloxacin Fatty Acids Conjugates. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *185*, 111810. [[CrossRef](#)]
 38. Navarro, S.; Mitjavila, M.T.; Katz, A.; Doly, J.; Vainchenker, W. Expression of interleukin 6 and its specific receptor by untreated and PMA-stimulated human erythroid and megakaryocytic cell lines. *Exp. Hematol.* **1991**, *19*, 11–17.
 39. Heinz, L.J.; Panetta, J.A.; Phillips, M.L.; Reel, J.K.; Shadle, J.K.; Simon, R.L.; Whitesitt, C.A. Inhibitors of amyloid beta-protein production. U.S. Patent 5814646 A1, 29 September 1998.



1,3-Disubstituted thiourea derivatives: Promising candidates for medicinal applications with enhanced cytotoxic effects on cancer cells

Paulina Strzyga-Łach^{a,*}, Dagmara Kurpios-Piec^a, Alicja Chrzanowska^a,
Jarosław Szczepaniak^b, Anna Bielenica^a

^a Chair and Department of Biochemistry, Medical University of Warsaw, Ul. Banacha 1, 02-097, Warsaw, Poland

^b Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences ul., Ciszewskiego 8, 02-786, Warsaw, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Arylthioureas
Anticancer activity
Cytotoxic effects
Metabolomic profile
3D culture

ABSTRACT

The distinct chemical structure of thiourea derivatives provides them with an advantage in selectively targeting cancer cells. In our previous study, we selected the most potent compounds, 2 and 8, with 3,4-dichloro- and 3-trifluoromethylphenyl substituents, respectively, across colorectal (SW480 and SW620), prostate (PC3), and leukemia (K-562) cancer cell lines, as well as non-tumor HaCaT cells. Our research has demonstrated their anticancer potential by targeting key molecular pathways involved in cancer progression, including caspase 3/7 activation, NF-κB (Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) activation decrease, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) secretion, ROS (Reactive Oxygen Species) production, and metabolite profile alterations. Notably, these processes exhibited no significant alterations in HaCaT cells. The effectiveness of the studied compounds was also tested on spheroids (3D culture). Both derivatives 2 and 8 increased caspase activity, decreased ROS production and NF-κB activation, and suppressed the release of VEGF in cancer cells. Metabolomic analysis revealed intriguing shifts in cancer cell metabolic profiles, particularly in lipids and pyrimidines metabolism. Assessment of cell viability in 3D spheroids showed that SW620 cells exhibited better sensitivity to compound 2 than 8. In summary, structural modifications of the thiourea terminal components, particularly dihalogenophenyl derivative 2 and para-substituted analog 8, demonstrate their potential as anti-cancer agents while preserving safety for normal cells.

1. Introduction

The search for effective anticancer agents has driven significant advancements in medicinal chemistry, leading to the exploration of various chemical classes and their potential therapeutic applications. Among these, thiourea derivatives have garnered considerable attention due to their unique chemical properties and demonstrated cytotoxic effects on cancer cells. Thiourea compounds belong to a class of organosulfur compounds characterized by the presence of a thiourea functional group (R–NH–C(S)–NH–R'). These derivatives possess remarkable potential for application in medicine owing to their ability to modulate biological processes and interact with specific cellular targets. Thioureas have gained recognition for their versatile pharmacological profiles, including antimicrobial, anti-inflammatory, and anticancer activities. In recent years, researchers have made substantial progress in synthesizing and characterizing novel derivatives of this group with improved

cytotoxic properties against a wide range of cancer cell lines (Saeed et al., 2010). These substances often exhibit potent antiproliferative effects, inducing apoptosis or cell cycle arrest, while sparing normal cells. This selectivity is crucial for reducing the toxic side effects associated with traditional chemotherapeutic agents (Zhang et al., 2020). One class of thiourea derivatives that has attracted significant interest is the diarylthiourea family (El-Atawy et al., 2023). Studies have demonstrated the anticancer potential of diarylthioureas by targeting key molecular pathways involved in cancer progression (El-Atawy et al., 2023; Sun et al., 2017). Another notable group of thiourea derivatives is the dithiocarbamates, which have exhibited remarkable cytotoxic effects against various cancer types. Dithiocarbamates exert their anticancer activity through multiple mechanisms, including the induction of oxidative stress, inhibition of proteasome function, and modulation of cellular redox balance (Buac et al., 2012; Quero et al., 2022). These compounds have shown promising results in preclinical studies,

* Corresponding author.

E-mail addresses: paulina.strzyga-lach@wum.edu.pl (P. Strzyga-Łach), dagmara.kurpios-piec@wum.edu.pl (D. Kurpios-Piec), achrzanowska@wum.edu.pl (A. Chrzanowska), jaroslaw.szczepaniak@sggw.edu.pl (J. Szczepaniak), anna.bielenica@wum.edu.pl (A. Bielenica).

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.176885>

Received 13 May 2024; Received in revised form 19 July 2024; Accepted 9 August 2024

Available online 14 August 2024

0014-2999/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

demonstrating their potential as effective anticancer agents (Kaul et al., 2021). Furthermore, investigations into the structure-activity relationships of thiourea-derived compounds have provided insights into the design and optimization of more potent derivatives with enhanced selectivity and improved pharmacokinetic properties (Kumar and Chimni, 2014). The specific design and modification of these structures have given a new pool of compounds: the thiourea derivatives with 1, 3-disubstitution. They have been documented to exhibit anti-proliferative effects against both solid tumor cell lines and leukemia. These derivatives have demonstrated a remarkable ability to minimize side effects. Particularly, the derivatives that displayed the highest effectiveness were those containing electron-withdrawing substituents incorporated into the terminal phenyl rings. In our previous study we selected from the group of 1,3-disubstituted thiourea derivatives, the most potent compounds: 2 (3,4-dichloro) and 8 (3-(trifluoromethyl)phenylthioureas (Fig. 1.) (Strzyga-Lach et al., 2021). The present study has demonstrated mechanisms of their anticancer activity against colorectal (SW480 and SW620), prostate (PC3) and leukemia (K-562) cancer cells by targeting key molecular pathways involved in cancer progression. They included activation of caspases, inhibition of NF- κ B activation and VEGF secretion, ROS production as well as changes of crucial metabolites profile. Moreover, the effectiveness of the studied compounds was also tested on spheroids of cancer cells (3D culture).

2. Materials and methods

2.1. Thiourea derivatives

The newly synthesized (1–12) 1,3 – disubstituted thioureas were tested for their potential antitumour activity and their detailed synthesis was described previously (Strzyga-Lach et al., 2021).

Analysis of cytotoxic effects of these compounds has shown that the most promising were derivatives incorporating 3,4-dichloro- (2) and 4-CF₃-phenyl (8) substituents. Selected compounds were highly cytotoxic against human colon (SW480, SW620), prostate (PC3) cancer cells, and leukemia K-562 cell lines ($IC_{50} \leq 10 \mu M$), with favorable selectivity over normal HaCaT cells. The structure of 2 and 8 thiourea derivatives and their molecular weight were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and MS (Strzyga et al., 2021).

2.2. Cell culture

The human cell lines used in this study, including primary colon cancer (SW480), metastatic colon cancer (SW620), metastatic prostate cancer (PC3), chronic myelogenous leukemia (K-562), and immortal keratinocyte (HaCaT) cell lines, were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) in Rockville, MD, USA. These cells were cultivated in specific culture media following established protocols, which included MEM (Minimal Essential Medium) for SW480 and SW620, RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) for PC3 and K-562, and DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) for HaCaT cells. The culture media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 μ g/mL). Cell cultures were maintained in a humidified incubator set at 37 °C with 5% CO₂ until they reached the appropriate level of confluence, typically

around 80–90%. Subsequently, the cells were harvested by treating them with 0.25% trypsin (obtained from Gibco Life Technologies in Waltham, MA, USA), with the exception of the non-adherent K-562 cell line, and were then used for further experiments.

2.3. Caspase-3 and caspase-7 activity determination

To assess the activity of executive caspases involved in apoptosis, the Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega, Madison, WI, USA) was employed. White 96-well luminometer plates were utilized for seeding cells at a density of 1×10^4 cells/well. After 24 h, the cells were treated with compounds 2 and 8 at their respective IC_{50} concentrations for 12, 24, and 48 h. The assay was then conducted following the instructions provided by the manufacturer. In summary, the Caspase-Glo 3/7 Buffer was combined with the Caspase-Glo 3/7 Substrate to create the Caspase-Glo 3/7 Reagent. Subsequently, 100 μ l of the Caspase-Glo 3/7 Reagent was added to the 96-well luminometer plates containing 100 μ l of a blank, negative control cells, or the treated cells in culture medium. The luminescence produced was measured after 3 h using a luminometer, specifically the Synergy HTX Multi-Mode Reader (BioTek Instruments, USA). The blank, consisting of culture medium with DMSO (Dimethyl Sulfoxide - the solvent of the tested compounds), was used to determine the background luminescence. The untreated cells served as the negative control.

2.4. CellROX test

ROS formation was measured using the CellROX - Oxidative Stress Reagents assay based on CellROX Green Reagent (Life Technologies, France). All the tested cell lines were seeded onto 96-well plates (5×10^4 cells per well) and pre-incubated for 24 h. Next, they were cultured with CellROX Reagent for 30 min at 37 °C in the dark, washed with PBS (Phosphate Buffered Saline) and treated for 2 h at 37 °C with phenol red-free culture medium containing the tested compounds at their IC_{50} concentrations. As a positive control, a sample with H₂O₂ (1,5 mM) was used, whereas a sample without any reagent was the negative control. The generation of ROS was measured by the Microplate Spectrofluorometer BioTek Synergy with the excitation/emission wavelength of 485/520 nm and expressed as fluorescence intensity (FI).

2.5. NF- κ B activity assay

NF- κ B p65 (Total/Phospho) ELISA Kit (Enzo Life Science, Plymouth Meeting, PA, USA) was utilized to measure the levels of total and phosphorylated nuclear factor- κ B (NF- κ B) in cell lysates. For the experiment, cells were seeded in 12-well plates at a density of 1×10^5 cells/well and incubated with complete medium for 24 h. Subsequently, the cells were treated with the respective IC_{50} concentrations of the compounds under investigation for a duration of 72 h. The resulting cell pellets were collected and lysed using Cell Lysis Buffer Mix (1X) and Cell Lysis Mix (5x) following the manufacturer's instructions. Prior to the experiment, an equal volume of capture antibody reagent and detection antibody reagent was prepared. Next, 50 μ L of whole cell lysate, a negative control cell lysis mix, or a positive control cell lysate were added to the pre-coated ELISA plate. Two types of antibody mixtures,

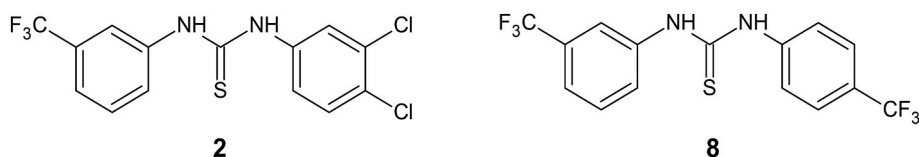


Fig. 1. The structure of studied thiourea derivatives.

1-(3,4-dichlorophenyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea (2)

1-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-3-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea (8).

total-NFκB p65 antibodies and phospho-NFκB p65 antibodies, were separately added to each well of the pre-coated plate containing the sample lysates (50 μL/well) and incubated for 1 h. The plate was then washed three times before the addition of a detection reagent, which was allowed to react for 10–30 min. The detection reaction was halted by adding a stop solution (100 μL/well), and the absorbance was promptly measured at 450 nm using a Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO). Subsequently, the ratio of phospho-NFκB p65 to total-NFκB p65 was calculated. The data were compared to the control (untreated cells) and presented as the percentage (mean ± standard deviation (SD)) of the control.

2.6. VEGF concentration assay

To evaluate the ability of tested compounds to inhibit VEGF secretion in cancer and non-cancer cell lines the Human VEGF ELISA kit was used (Life Technologies, France, #KHG0111). The cells were pated in 6-well plate at a concentration of 1×10^5 cells/well. After 72 h incubation of cells with compounds 2 and 8, the medium was collected and used for VEGF analysis according to the manufacturer's instruction. The absorbance was detected with a microplate reader at 450 nm. The results were represented as pg/ml.

2.7. Untargeted metabolomic analysis

To the standardized number (0.5×10^5) of pre-lysed cells (by a freeze-thaw cycle), 100 μl of ice cold (−20 °C) methanol (LC-MS hyper grade, Merck) was added and then the samples were centrifuged ($18,000 \times g$, −10 °C, 30 min). After this step, 80 μl of the supernatant was lyophilized at 22 °C using a concentrator (Eppendorf). Just before injection the lyophilizate was dissolved in a mixture (50:50 ratio) of ddH₂O and acetonitrile supplemented with 0.1% formic acid. The comprehensive analysis of all the measurable analytes with the both positive and negative polarity was conducted using Solarix 2xR 7T (ultra-high resolution Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry with an electrospray ion source) in straight injection course (flow rate of 300 μl/h). The capillary in the ion source was given to 4500 V (positive polarity) and 3500 V (negative polarity) whereas the ions accumulation time was set to 0.03 s, with the dry gas flow set to 4.0 L/min and drying temperature 200 °C. The assembled MS data were analyzed using the T-Rex 2D algorithm (MRMS single spectra) in the MetaboScape 5.0 software (Bruker). The identification of compounds were accomplished to specific signalling pathways using MetaboAnalyst 5.0 and the KEGG database.

2.8. 3D culture of SW620 cell line

Hydrogel (with cell suspension) was formed and cultured in 8-well confocal chamber slide according to manufacturer's instruction (True-Gel3D Hydrogel Kits, Merck Millipore, Darmstadt, Germany). When the spheroid culture was formed, it was treated with the selected compounds. Then staining was performed using Live-Dead Cell Viability Assay Kit for 3D and 2D Cell Culture (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Briefly, the mixture of culture medium and PBS in 1:1 ratio was supplemented with dyes: Calcein AM (stains live cells), Propidium iodide (stains dead cells) and Hoechst 33342 (stains all cells) and added to 3D cell culture after aspiration of cell medium. The cell viability was analyzed using confocal microscope FV10-ASW 4.2 Olympus and ImageJ. Photos were processed in ImageJ 1.53t.

2.9. Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the Statistica 13.0 (StatSoft, Inc, USA) program. Comparison between studied groups was performed by ANOVA with Dunnett's multiple comparison post hoc test. Data were expressed as means ± SD from 3 separate experiments

performed in triplicate and considered statistically significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Increase of caspase 3/7 activity

Following the previous observation of an increase in Annexin-positive cells upon treatment with nearly all the tested compounds, it was imperative to investigate the involvement of executioner caspases 3/7 in this process. The activity of Caspases 3/7 was assessed using the Caspase-Glo 3/7 Assay in all tested cell lines, exposing them to studied compounds 2 and 8 at their IC₅₀ concentrations for 12, 24 and 48 h (Table 1). Both thiourea derivatives enhanced the activity of caspases 3/7 in cancer cell lines while showing no impact on their activity in normal HaCaT cells. It's noteworthy that thiourea 2 exhibited stronger activation compared to compound 8, which correlates with the apoptosis analysis by flow cytometry from our previous study (Strzyga-Lach et al., 2021). The most pronounced increase of these enzymes activity was noted in SW480 cell line upon exposure to both compounds for 12 h (by 97% and 102%, respectively). The similar rise was observed in SW620 cell line treated with compound 2 for the same duration (by 104%). In contrast, the increase of caspases activity in SW620 after treatment with compound 8 for 12 h was the weakest (by 20%). Subsequently, the caspase activity gradually decreased in colon cancer cell lines exposed to these derivatives to levels comparable to those seen in normal HaCaT cells after 48 h. In PC3 cells, compound 2 raised caspase activity by 29% after 12 h, then returning to levels similar to those in HaCaT cells. Conversely, derivative 8 increased caspase activity by 51% in prostate cancer cells, but this rise was noted after 48 h. Notably, in the K562 cell line, the activity of caspases 3/7 surged by 64% and 38% after 24 h of exposure to compounds 2 and 8, respectively.

3.2. ROS formation

The generation of reactive oxygen species (ROS) in tumour cell lines using thiourea derivatives is an area of significant interest in cancer research. Researchers are exploring the use of specific thiourea derivatives to induce ROS production in tumour cells as a potential therapeutic strategy. Elevated ROS levels can lead to oxidative stress, which can damage cellular components and trigger apoptosis in cancer cells. An investigation into the impact of apoptosis-inducing compounds (2 and 8) on ROS levels in four different cancer cell cultures and non-tumor cell lines (HaCaT) was conducted after 2 h of incubation (Fig. 2). The

Table 1

The effect of selected compounds (2 and 8) on caspase-3/caspase-7 activity. Cells were incubated for 12, 24, or 48 h with the tested compounds used at their IC₅₀ concentrations. Data are expressed as % of control and as the mean ± SD. ****p ≤ 0.0001; ***p ≤ 0.001; **p ≤ 0.01; *p ≤ 0.05 as compared to the control.

Cell line	Time of incubation [h]	2 [% of control]	8 [% of control]
SW480	12	197 ± 3.11****	202 ± 4.90****
	24	154 ± 2.54***	158 ± 9.75***
	48	113 ± 6.43	114 ± 11.38
SW620	12	204 ± 8.30****	120 ± 2.17*
	24	163 ± 4.54****	99 ± 3.67
	48	106 ± 7.35	93 ± 4.54
PC3	12	129 ± 0.84*	101 ± 2.61
	24	110 ± 8.20	127 ± 2.68*
	48	103 ± 4.17	151 ± 15.83***
K-562	12	114 ± 9.97	103 ± 6.92
	24	164 ± 9.97***	138 ± 8.98**
	48	119 ± 8.06	101 ± 6.85
HaCaT	12	120 ± 11.29	116 ± 8.69
	24	109 ± 14.14	107 ± 3.33
	48	98 ± 11.10	97 ± 4.66

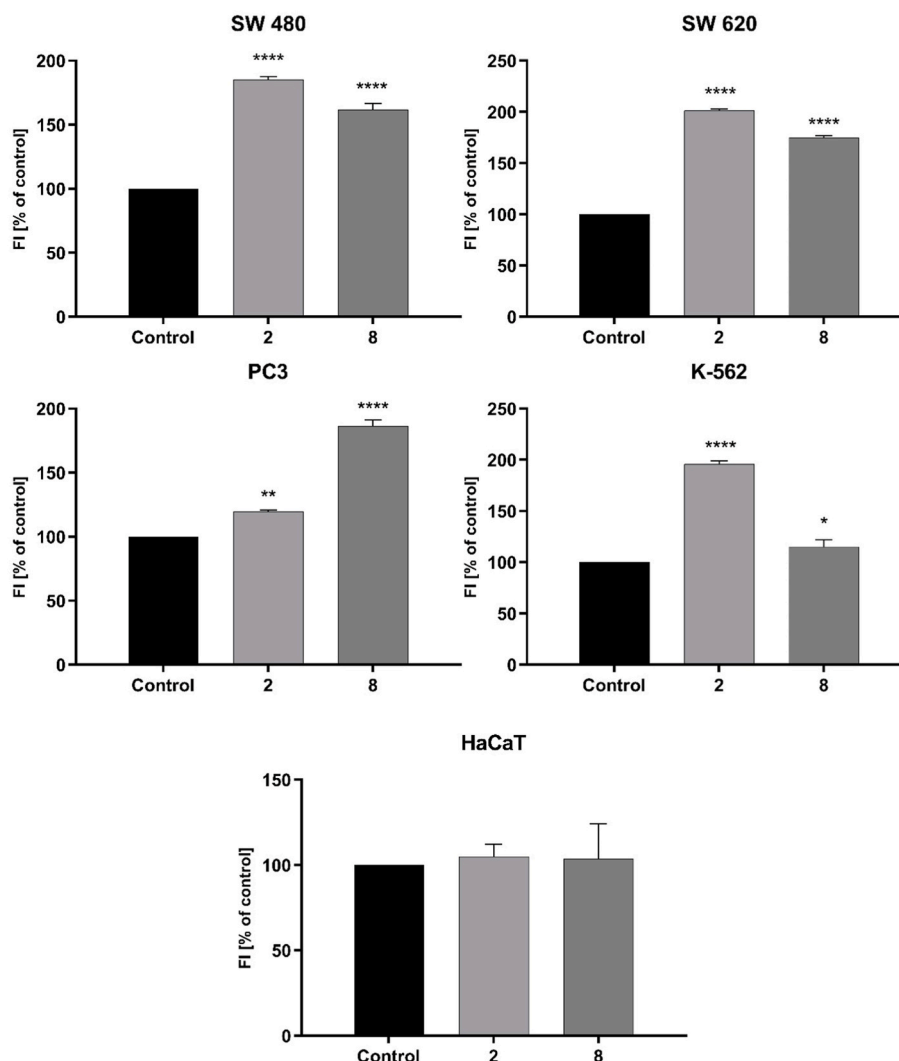


Fig. 2. Effects of selected compounds on ROS production in SW480, SW620, PC3, K-562 and HaCaT cells. FI (fluorescence intensity) of the CellROX® Green Reagent in the presence of selected compounds at their IC50 concentrations for 2 h **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$ as compared to the control.

increase in ROS levels was more pronounced in both colon SW480, SW620, and leukemia K-562 cells when treated with derivative 2 compared to compound 8. Compound 2 intensified ROS production in the metastatic SW620 cell line more strongly (by 101%) than in primary SW480 cells (85%). A similar correlation is evident in the case of derivative 8, with increases recorded at 75% and 61%, respectively. Thiourea 2 nearly doubled the ROS levels in K-562 cell lines, while derivative 8 in the mentioned cell culture increased them by 15%. In contrast to the previous cell lines, in PC3 cell line the derivative 8 exhibited a significantly stronger impact on ROS, resulting in an 86% increase, while compound 2 caused an increase of only 19%. The heightened production of ROS has the potential to trigger apoptosis or necrosis in cancer cells. The extent of ROS generation was found to be the least pronounced in HaCaT cells (3.3–5%). This observation aligns with a limited induction of caspase-dependent apoptosis and reduced cytotoxicity, as evidenced by the results of the MTT assay shown in our previous work (Strzyga-Lach et al., 2021).

3.3. NF- κ B p65 activity

Given the tumour-promoting effects of NF- κ B, the current therapeutic approach focuses on suppressing NF- κ B activation. To assess the impact of selected thiourea derivatives 2 and 8 on NF- κ B activation, it was conducted an NF- κ B p65 (Total/Phospho) ELISA Kit assay. This

assay is based on the concept that NF- κ B becomes activated upon phosphorylation. Therefore, a higher ratio of phospho/total NF- κ B indicates increased NF- κ B activation.

Both thiourea derivatives exhibited inhibitory effects on NF- κ B activation in cancerous cells but not in non-tumor HaCaT cells (Fig. 3). The reduction in NF- κ B activity was the most pronounced in prostate cancer cells, where NF- κ B activity decreased by 63% and 34% of control, respectively. Likewise in liquid tumor “leukemia” the reducing effect for NF- κ B activation was similar for both compounds, and accounted by around 30%. The similar inhibitory effect was observed in primary (SW480) and metastatic (SW620) colon cancer cells. The reduction in NF- κ B activity in SW480 line was by 33% (for derivative 2) and 28% (for compound 8), while in SW620 cells, by 30% and 31%, respectively.

3.4. VEGF secretion

Angiogenesis is essential not only for many physiological processes but also for various pathological conditions, including tumor growth and metastasis. Therefore, among therapeutic perspectives for treating primary malignant human tumors and their metastases is to interrupt angiogenesis pathways. One of the target in these process can be vascular endothelial growth factor (VEGF), which concentration was evaluated in culture medium of cancer and normal cell lines treated with studied compounds 2 and 8 (Fig. 4). Our analysis revealed that both

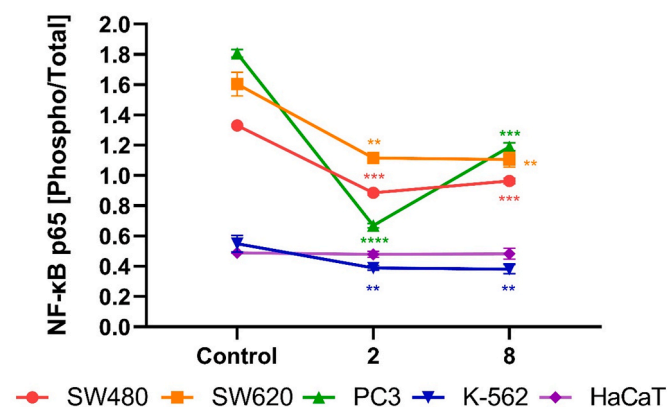


Fig. 3. The effect of compounds 2 and 8 on NF- κ B activation. Cancer and normal cells were treated with studied compounds at their IC_{50} concentrations for 72 h. Data are expressed as ratio of Phospho/Total p65 NF- κ B. Data are expressed as the mean $\pm$ SD. **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$ as compared to the control.

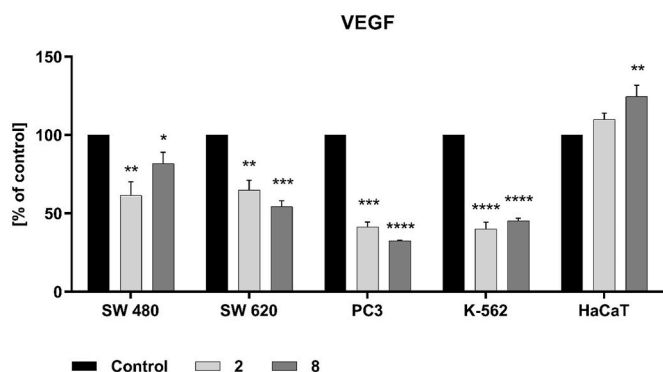


Fig. 4. Effects of compounds 2 and 8 on VEGF secretion, measured by the ELISA test. Cells were incubated for 72 h with tested compounds at their IC_{50} . Data are expressed as the mean $\pm$ SD. **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$ as compared to the control.

compounds inhibited VEGF secretion in cancer cell lines while maintained the same concentration in HaCaT cells compared to control cells. Thiourea derivative 2 was more potent in SW480 and K562 cells than in the rest of cancer cell lines, while compound 8 had better inhibitory effect in SW620 and PC3 cells. Prostate cancer cells were the most sensitive with decrease of VEGF amount by 68% after incubation with compound 8. Similarly, PC3 and K562 were the most responsive to compound 2 which reduced the amount of VEGF by around 60% in these cell lines. The decrease of VEGF in K562 after incubation with derivative 8 was lower than after treatment with compound 2, by 55%. Colon cancer cell lines, SW480 and SW620 were less susceptible to both compounds. After treatment with compound 2, the concentration of VEGF in these cell lines were decreased by 38 and 35%, respectively. In contrast, derivative 8 gave better effect in SW620 cells, than in SW480 cells, with reduction of VEGF amount by 46% and 18%, respectively.

3.5. Metabolomic analysis

Assay of metabolomic profile in all cancer cells showed significant changes in various pathways including: arachidonic acid, steroids, sphingolipid and pyrimidines metabolism.

We analyzed the metabolomes of all studied type of cancer cells and observed that the metastatic colon cancer cell line SW620 was the most metabolically altered after treatment with tested thiourea derivatives (Fig. 5, Supplementary material). Thus, primary colon cancer cells

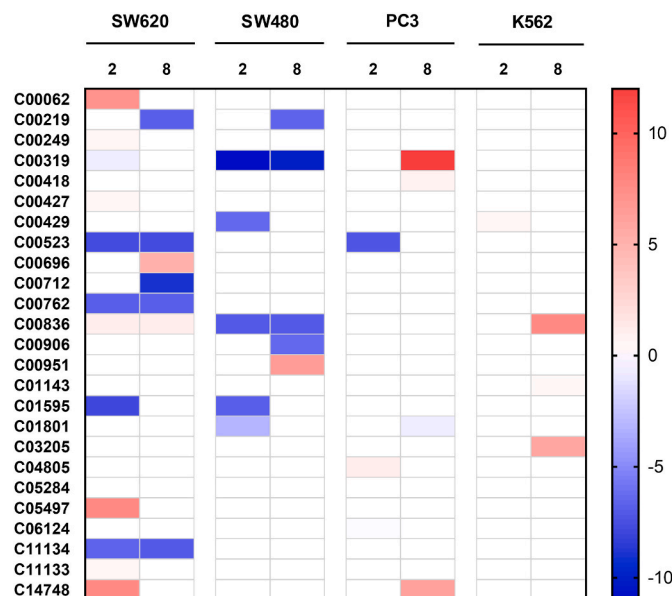


Fig. 5. Heat map of metabolites involved in discussed biological processes. Metabolomic analysis was provided after 72h for compounds 2 and 8 in SW620, SW480, PC3 and K562 cells. In this graph are presented only metabolites with significantly changed concentration in comparison to untreated group (for each cell line). The row labels correspond to the KEGG ID characteristic for each metabolite i.e., C00062 - L-Arginine, C00219 - Arachidonic acid, C00249 - Palmitic acid, C00319 - Sphingosine, C00418 - Mevalonic acid, C00427 - Prostaglandin H2, C00429 - Dihydrouracil, C00523 - Androsterone, C00696 - Prostaglandin D2, C00712 - Oleic acid, C00762 - Cortisone, C00836 - Sphinganine, C00906 - Dihydrothymine, C00951 - Estradiol, C01143 (S)-5-Diphosphomevalonic acid, C01595 - Linoleic acid, C01801 - Deoxyribose, C03205 - Deoxycorticosterone, C04805 - 5-HETE, C05284 11b Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione, C05497 - 21-Deoxycortisol, C06124 - Sphingosine-1-phosphate, C11134 - Testosterone glucuronide, C11133 - Estrone glucuronide, C14748 - 20-HETE.

(SW480) exhibited suppressed pyrimidines catabolism and reduction in intensity of sphingolipids metabolism after treatment with compounds 2 or 8. The greatest changes in the intensity of the lipid metabolites was noticeable in the metastatic colon cancer cells (SW620), as well as differences in arginine metabolism were observed in the presence of compound 2. Both thioureas increased the metabolites intensity of arachidonic acid, such as prostaglandin H2, E2 as well as 5-HETE. Moreover, metabolites have been reduced under the action of selected thiourea derivatives, including steroid hormone derivatives a.o.: cortisone, androsterone and testosterone.

We also observed differences in the metabolome of metastatic prostate cancer cells PC3. After administration of derivative 2, the rise of 5-HETE was observed, meanwhile the set of reduced metabolites included, mainly steroid-derived, such as androsterone, but also sphingosine. Compound 8 also changed metabolome in PC3 line, but stronger than derivative 2. In the group of metabolites with increased intensity were 5-HETE, metabolites of cholesterol synthesis (mevalonic acid) and sphingolipid metabolites, whereas in the group of reduced metabolites there were no significant changes beside drop of deoxyribose.

Interestingly, in leukemias (hematological malignancy) after treatment with derivative 2, uracil catabolism was positively affected, whereas no significant silencing of metabolic pathways was noted. Moreover, stimulation of sphingolipid, cholesterol and steroid hormones metabolism was observed.

In addition, a less changes in arachidonic metabolism after treatment with compound 2 and intensification of steroidogenesis after treatment with compound 8 were observed in HaCaT cells.

3.6. Viability of 3D culture of SW620 cells

The evaluation of 3D culture viability revealed that the examined thiourea derivatives displayed greater cytotoxicity towards SW620 cells, compared to the control (Fig. 6). Compound 2 exhibited a more potent cytotoxic effect than compound 8, evident from the higher fluorescence intensity (FI) of propidium iodide. Additionally, ImageJ analysis of FI indicated a 73% reduction in the viability of SW620 cells treated with compound 2 compared to the control (85%). Meanwhile, the percentage of viable SW620 cells exposed to compound 8 decreased by 16%.

4. Discussion

Our previous research revealed the potent anticancer activity of thiourea derivatives, specifically the dihalogenophenyl derivative 2 and its para-substituted analog compound 8 (Strzyga-Lach et al., 2021). This current study aims to further explore and understand the mechanisms underlying their cytotoxicity in cancer cells.

Apoptosis is a crucial process targeted by anticancer drugs (Pfeffer and Singh, 2018). Our earlier research showed that thiourea derivatives induce apoptosis in various cancer cell lines (Strzyga-Lach et al., 2021). Herein, induced apoptosis was confirmed by measurement of caspase 3/7 activity. Caspase-3 plays a crucial role in apoptosis induced by cytotoxic drugs, radiotherapy, or immunotherapy in cells (Zhou et al., 2018). Once activated by proteolytic cleavage, it commits the cell to programmed death, making it a reliable indicator of cancer therapy effectiveness (Huang et al., 2017). Thiourea derivatives 2 and 8 activated caspases 3/7 in all tested cancer cell lines, with the most significant effect observed in SW480 cells. Interestingly, metastatic SW620 and leukemia K562 cells were more sensitive to compound 2, while prostate cancer cells responded better to compound 8. These findings correlate with apoptosis measured by flow cytometry and suggest that apoptosis induced by thiourea derivatives may rely on caspase 3/7 activation.

The cytotoxicity of many chemotherapeutics such as anthracyclines,

platinum complexes, and camptothecins involves increase of the ROS level, resulting in a change of the cell redox state (Marullo et al., 2013). ROS serve dual roles in cancer cells: at low levels, they promote cell proliferation, migration, and angiogenesis, while at high levels, they induce cell death (Gorrini et al., 2013; Pelicano et al., 2004). Cancer cells have higher ROS levels due to enhanced antioxidant systems, making them sensitive to external stimuli that further increase ROS production (Perillo et al., 2020). Therefore, increase of ROS level in tumor cells is crucial, as it holds the potential to influence apoptotic pathways in cancer cells. Exposure to thiourea derivatives 2 and 8 resulted in elevated ROS levels in cancer cell lines, with differences observed depending on type of substituent or to the sensitivity of the cell lines. Derivative 2 demonstrated greater efficacy to colon cancer and leukemia cells, while prostate cancer cells responded better to compound 8. This aligns with the induction of apoptosis and cytotoxicity observed with these compounds. The thiourea derivatives have been observed to induce apoptosis by generating burst of ROS. The complexes of N,N-disubstituted cyclic metallothiourea ligands have activated ROS generation in HeLa cells, decreased the mitochondrial membrane potential followed by the release of Cyt-C, and initiated a cascade of caspase 9 and caspase 7, which are effectors in apoptosis (Yu et al., 2020).

Since ROS can modulate various signalling pathways through redox-sensitive transcription factors, we have assessed their impact on NF- κ B. ROS can regulate the NF- κ B cascade both positively, in the early phase, by enhancing NF- κ B activation, and negatively, in the late phase, by inhibiting its activation (Khan et al., 2021). The constitutive expression of NF- κ B represents a defensive strategy employed by cancer cells to counteract apoptosis by promoting proliferation, invasion and metastasis, remodelling cancer cell metabolism and inducing therapeutic resistance (Aggarwal and Sung, 2011; Rasmi et al., 2020). Therefore, inhibition of this transcription factor signalling pathway may have promising anticancer effects and may improve existing cancer therapies (Park and Hong, 2016). Studied thiourea derivatives significantly reduced NF- κ B activity across various cancer cell lines with no notable

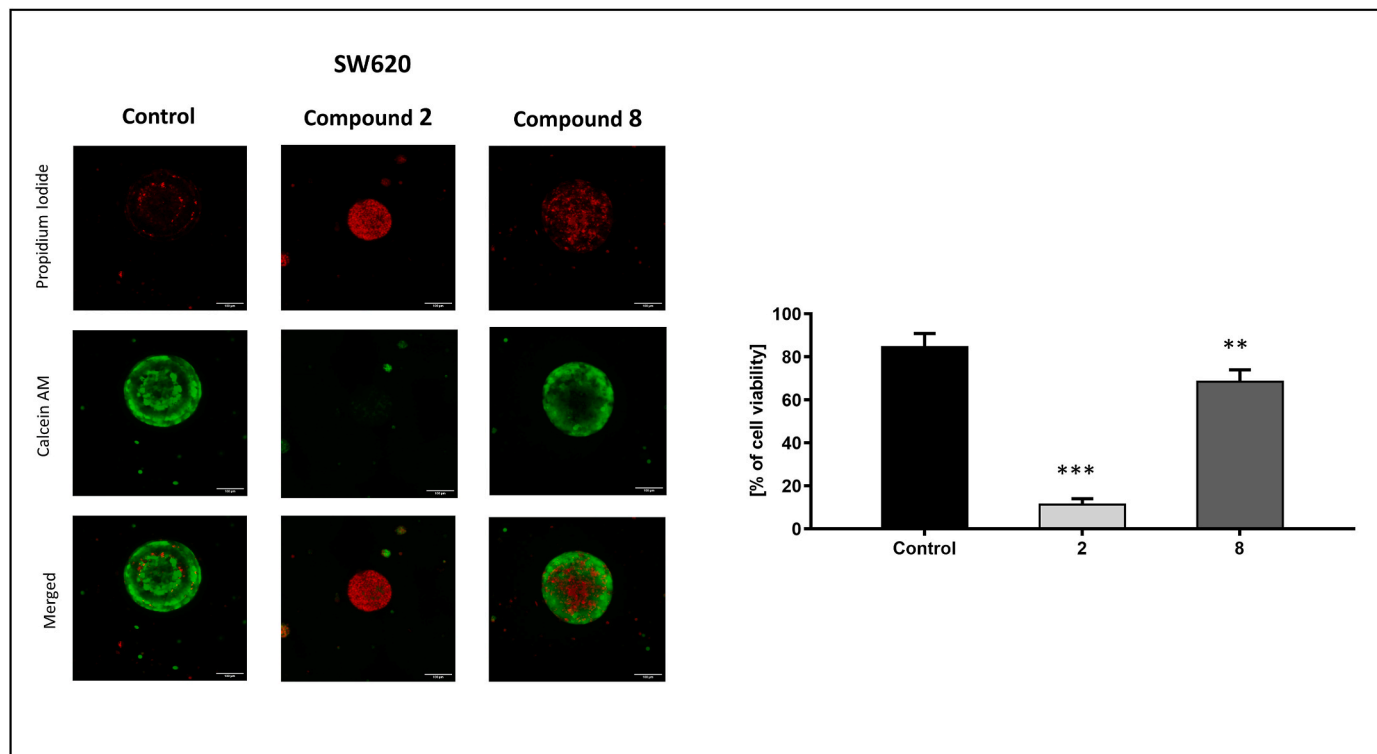


Fig. 6. Growth and viability analysis of the 3D tumour spheroids. Representative confocal fluorescence microscopy images of SW620 spheroids after treatment with 2 and 8 compound. The spheroids were stained with calcein AM (green), propidium iodide (red) and hoechst 33342 (blue). Scale bars = 100 μ m *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.02$.

changes observed in non-cancer HaCaT cells. Compound 2 exhibited stronger suppression, particularly in PC3 cells decreasing NF- κ B activity by 63%, while compound 8 reduced it by 34%. Notably, metastatic cancer cells showed higher basal levels of activated NF- κ B compared to non-metastatic and normal cells, suggesting its importance in cancer migration and invasion (Yan et al., 2010). The NF- κ B pathway plays a crucial role in angiogenesis by regulating the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) (Rastogi et al., 2023; Zhang and Luo, 2018). Cancer cells produce VEGF to stimulate angiogenesis, which is essential for tumour growth and metastasis. The overexpression of VEGF is associated with more aggressive and metastatic type of cancers. Furthermore, the increasing evidences have shown that VEGF plays significant role in haematological malignancies, by inducing mitotic responses, initiating growth, promoting survival and migration and enhancing the self-renewal of leukemia progenitor cells (Medinger and Passweg, 2014; Song et al., 2012, 2020). VEGF levels were markedly elevated in CML patients, especially during the blast crisis phase, than in normal controls (Chen et al., 2015). Inhibition of VEGF suppresses K562 cell proliferation, highlighting its role in angiogenesis and leukemic cell growth (He et al., 2003). Thiourea derivatives, synthesized based on the clinically used sorafenib, have shown promise as anti-angiogenic compounds (Al-Ansary et al., 2021; Bai et al., 2020; Elebiyo et al., 2022; Sun et al., 2018). Benzimidazole thiourea derivatives revealed anticancer and anti-VEGF2 activity in leukemia cell lines (Aboutaleb et al., 2023), while 1,3,4 - thiadiazine-thiourea compound 5j exhibited inhibitory activity of VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2), close to sorafenib in non-small cell lung cancer cell line A549 (Ragab et al., 2019). In our study, these derivatives demonstrated potent inhibitory effects on VEGF expression, particularly in PC3 and K562 cells, followed by SW620 and SW480 cells.

The positive response observed in metastatic cancer cell lines to these thiourea derivatives is particularly encouraging, given the significant role of metastasis in cancer-related mortality. Metastatic cancer cells produce various angiogenic factors that promote neo-vascularization, motility, and invasion into surrounding tissues, contributing to disease progression. Therefore, targeting angiogenesis with compounds like thiourea derivatives holds promise for improving cancer treatment outcomes (Vene et al., 2012).

Metabolic changes play a pivotal role in both carcinogenesis and tumour progression, affecting various cellular processes such as growth, autophagy, apoptosis, and drug resistance. Several metabolites, including nucleotides, cholesterol, steroids, and sphingolipids, are closely associated with tumour aggressiveness and invasiveness. Any alterations in metabolism can profoundly influence cancer development and response to treatment. Our comparison of metabolic profiles revealed significant changes, with the most pronounced alterations observed in SW620 cells. However, we also observed intriguing changes in SW480, PC3 and K-562 cells following exposure to modified thiourea derivatives. Notably, primary colon cancer cells exhibited decreased levels of sphingosine and sphinganine. Sphingosine 1-phosphate (S1P), a metabolite derived from sphingosine, has been implicated in various processes related to tumorigenesis, including inflammation and neo-vascularization (Garcia-Barros et al., 2014; Pyne and Pyne, 2010).

Prostaglandins (PGs) have dual effects on tumour development, with their role depending on various factors like the target tissue, their plasma concentration, and the prostaglandin subtype (Wang et al., 2022). Prostaglandin D2 (PGD2) seems to inhibit tumour progression contributing to the less expansion of gastric adenocarcinoma by inhibiting the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) pathway or regulation of the tumour microenvironment, limiting excessive responses to vascular permeability and TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) production (Jara-Gutierrez and Baladron, 2021; Murata et al., 2011). However, ongoing research is continuously exploring to establish the unequivocal positive or negative role of this prostaglandin in CRC (Colorectal Cancer).

Metastatic colorectal cancer cells exhibit reduced levels of steroid

hormones like progesterone, pregnenolone, and cortisol. Hormones play varied roles in colon cancer progression: estrogen and glucocorticoids may boost tumour growth, while androgens and progesterone may suppress it. Tumor-derived glucocorticoids may modulate anti-tumor immune responses and consequently facilitate tumor evasion from the immune system (Sidler et al., 2012; Zhang et al., 2021).

The metabolome of PC3 cells changed with the increase of 5-HETE and the reduction of androsterone and sphingosine in the presence of compound 2 whereas after treatment with compound 8 these metabolites were in higher concentrations and only depletion of deoxyribose was observed. It seems that the action of compound 2 led to more favorable metabolic changes due to the reduction of compounds involved in tumor progression (Penning and Detlefsen, 2020).

Moreover, leukemia cells affected by compound 8 showed the stimulation of sphingolipid, cholesterol and steroid hormones metabolism. Those metabolites can increase aggressiveness and invasiveness of cancer (Watek et al., 2017).

The analysis of cytotoxicity, proapoptotic activity and metabolomics has shown that thiourea derivative 2 exhibited significant and interesting alteration in SW620 cells. Subsequently, we investigated its consistency in cytotoxic effect within 3D cultured SW620 cells, providing a more physiologically relevant environment compared to flat cultures (Freitas de Morais et al., 2023). Assessment of 3D cell culture viability confirmed higher cytotoxicity of both compounds compared to the control. Notably, the viability of SW620 spheroids exposed to compound 2 was significantly lower than that observed in 2D cell culture, indicating a potentially favorable bioavailability profile for compound 2. In contrast, 3D culture of metastatic colon cancer cells showed less sensitivity to derivative 8 than 2D cell cultures.

Similar results were obtained by Jonson et al. after treatment of SW620 spheroids with standard anticancer drugs: oxaliplatin (OX) and fluorouracil (FU) (Johnson et al., 2022). These drugs exhibited lower effectiveness in 3D culture than in monolayer. Enhanced drug resistance in 3D culture may result from factors like altered phenotype and genotype, intercellular signalling via ECM (Extracellular Matrix) interactions, limited diffusion, hypoxia-induced gene activation for cell survival and drug sensitivity, cell stage variations, and surface receptor expression changes (Edmondson et al., 2014).

5. Conclusion

In conclusion, thiourea derivatives represent a promising class of compounds with significant potential for medicinal applications, particularly in the field of cancer therapeutics. The recent advancements in the design and synthesis of thiourea compounds have yielded analogues with potent cytotoxic effects on cancer cells, while ongoing research continues to uncover their underlying mechanisms of action. These studies contribute to the growing body of knowledge surrounding the development of thiourea derivatives as effective anticancer agents and hold promise for the future of personalized and targeted cancer treatments.

Funding

The work was carried out as part of the project "Study of the mechanisms of cytotoxic activity of 1,3-disubstituted thiourea derivatives," No 1WK/3/M/MB/N22, implemented in the years 2022–2023, financed by a grant for science, obtained by the Medical University of Warsaw.

Metabolomic analysis was performed using CePT consortium infrastructure.

CRedit authorship contribution statement

Paulina Strzyga-Lach: Writing – original draft, Visualization, Project administration, Methodology, Investigation, Funding

acquisition, Formal analysis, Data curation. **Dagmara Kurpios-Piec:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Supervision, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Alicja Chrzanowska:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Supervision, Methodology, Formal analysis, Conceptualization. **Jarosław Szczepaniak:** Methodology, Investigation, Data curation. **Anna Bielenica:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Conceptualization.

Declaration of competing interest

Declaration of competing interest: All authors declare that there are no conflicts of interest.

Data availability

Data will be made available on request.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.176885>.

References

- Aboutaleb, M.H., El-Gohary, N.S., Ghabbour, H.A., El-Kerdawy, M.M., 2023. Design, synthesis, and evaluation of new benzimidazole thiourea derivatives as antitumor agents. *Arch. Pharmazie* 356, 2300269.
- Aggarwal, B.B., Sung, B., 2011. NF- κ B in cancer: a matter of Life and death. *Cancer Discov.* 1, 469–471.
- Al-Ansary, G.H., Nasr, T., Taha, H., Fayad, W., Mahgoub, S., 2021. Biphenylurea/thiourea derivatives tagged with heteroarylsulfonamide motifs as novel VEGFR2 inhibitors; Design, synthesis and anti-angiogenic activity. *Bioorg. Chem.* 107, 104640.
- Bai, W., Ji, J., Huang, Q., Wei, W., 2020. Synthesis and evaluation of new thiourea derivatives as antitumor and antiangiogenic agents. *Tetrahedron Lett.* 61, 152366.
- Buac, D., Schmitt, S., Ventro, G., Kona, F.R., Dou, Q.P., 2012. Dithiocarbamate-based coordination compounds as potent proteasome inhibitors in human cancer cells. *Mini Rev. Med. Chem.* 12, 1193–1201.
- Chen, H., Shen, Y.F., Gong, F., Yang, G.H., Jiang, Y.Q., Zhang, R., 2015. Expression of VEGF and its effect on cell proliferation in patients with chronic myeloid leukemia. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 19, 3569–3573.
- Edmondson, R., Broglie, J.J., Adcock, A.F., Yang, L., 2014. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev. Technol.* 12, 207–218.
- El-Atawy, M.A., Alsabaie, M.S., Alazmi, M.L., Hamed, E.A., Hanna, D.H., Ahmed, H.A., Omar, A.Z., 2023. Synthesis, characterization, and anticancer activity of new N,N'-Diarylthiourea derivative against breast cancer cells. *Molecules* 28.
- Elebiyo, T.C., Rotimi, D., Evbuomwan, I.O., Maimako, R.F., Iyobhebhe, M., Ojo, O.A., Oluba, O.M., Adeyemi, O.S., 2022. Reassessing vascular endothelial growth factor (VEGF) in anti-angiogenic cancer therapy. *Cancer Treatment and Research Communications* 32, 100620.
- Freitas de Moraes, E., Siquara da Rocha, L.O., de Souza Santos, J.L., Freitas, R.D., Souza, B.S.F., Coletta, R.D., Gurgel Rocha, C.A., 2023. Use of three-dimensional cell culture models in drug assays for anti-cancer agents in oral cancer: protocol for a scoping review. *J. Personalized Med.* 13.
- Garcia-Barros, M., Coant, N., Truman, J.P., Snider, A.J., Hannun, Y.A., 2014. Sphingolipids in colon cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 773–782.
- Gorini, C., Harris, I.S., Mak, T.W., 2013. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 931–947.
- He, R., Liu, B., Yang, C., Yang, R.C., Tobelem, G., Han, Z.C., 2003. Inhibition of K562 leukemia angiogenesis and growth by expression of antisense vascular endothelial growth factor (VEGF) sequence. *Cancer Gene Ther.* 10, 879–886.
- Huang, J.-S., Yang, C.-M., Wang, J.-S., Liou, H.-H., Hsieh, I.-C., Li, G.-C., Huang, S.-J., Shu, C.-W., Fu, T.-Y., Lin, Y.-C., Ger, L.-P., Liu, P.-F., 2017. Caspase-3 expression in tumorigenesis and prognosis of buccal mucosa squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 8.
- Jara-Gutierrez, A., Baladron, V., 2021. The role of prostaglandins in different types of cancer. *Cells* 10.
- Johnson, P.A., Menegatti, S., Chambers, A.C., Alibhai, D., Collard, T.J., Williams, A.C., Bayley, H., Perriman, A.W., 2022. A rapid high throughput bioprinted colorectal cancer spheroid platform for in vitro drug- and radiation-response. *Biofabrication* 15.
- Kaul, L., Suss, R., Zannettino, A., Richter, K., 2021. The revival of dithiocarbamates: from pesticides to innovative medical treatments. *iScience* 24, 102092.
- Khan, A.Q., Rashid, K., AlAmodi, A.A., Agha, M.V., Akhtar, S., Hakeem, I., Raza, S.S., Uddin, S., 2021. Reactive oxygen species (ROS) in cancer pathogenesis and therapy: an update on the role of ROS in anticancer action of benzophenanthridine alkaloids. *Biomed. Pharmacother.* 143, 112142.
- Kumar, V., Chimni, S., 2014. Recent developments on thiourea based anticancer chemotherapeutics. *Anti Cancer Agents Med. Chem.* 15.
- Marullo, R., Werner, E., Degtyareva, N., Moore, B., Altavilla, G., Ramalingam, S.S., Doetsch, P.W., 2013. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One* 8, e81162.
- Medinger, M., Passweg, J., 2014. Role of tumour angiogenesis in haematological malignancies. *Swiss Med. Wkly.* 144, w14050.
- Murata, T., Aritake, K., Matsumoto, S., Kamauchi, S., Nakagawa, T., Hori, M., Momotani, E., Urade, Y., Ozaki, H., 2011. Prostaglandin D2 is a mast cell-derived antiangiogenic factor in lung carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 19802–19807.
- Park, M.H., Hong, J.T., 2016. Roles of NF- κ B in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches. *Cells* 5, 15.
- Pelicano, H., Carney, D., Huang, P., 2004. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist. Updates* 7, 97–110.
- Penning, T.M., Detlefsen, A.J., 2020. Intracrinology-revisited and prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 196, 105499.
- Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G., Migliaccio, A., 2020. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp. Mol. Med.* 52, 192–203.
- Pfeffer, C.M., Singh, A.T.K., 2018. Apoptosis: a target for anticancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- Pyne, N.J., Pyne, S., 2010. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 489–503.
- Quero, J., Royo, J.C., Fodor, B., Gimeno, M.C., Osada, J., Rodríguez-Yoldi, M.J., Cerrada, E., 2022. Sulfonamide-derived dithiocarbamate gold(I) complexes induce the apoptosis of colon cancer cells by the activation of caspase 3 and redox imbalance. *Biomedicines* 10, 1437.
- Ragab, F.A.F., Abdel-Aziz, S.A., Kamel, M., Ouf, A.M.A., Allam, H.A., 2019. Design, synthesis and biological evaluation of some new 1,3,4-thiadiazine-thiourea derivatives as potential antitumor agents against non-small cell lung cancer cells. *Bioorg. Chem.* 93, 103323.
- Rasmi, R.R., Sakthivel, K.M., Guruvayoorappan, C., 2020. NF- κ B inhibitors in treatment and prevention of lung cancer. *Biomed. Pharmacother.* 130, 110569.
- Rastogi, S., Aldosary, S., Saeed, A.S., Ansari, M.N., Singh, M., Kaithwas, G., 2023. NF- κ B mediated regulation of tumor cell proliferation in hypoxic microenvironment. *Front. Pharmacol.* 14.
- Saeed, S., Rashid, N., Jones, P.G., Ali, M., Hussain, R., 2010. Synthesis, characterization and biological evaluation of some thiourea derivatives bearing benzothiazole moiety as potential antimicrobial and anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 1323–1331.
- Sidler, D., Renzulli, P., Schnoz, C., Berger, B., Schneider-Jakob, S., Fluck, C., Inderbitzin, D., Corazza, N., Candinas, D., Brunner, T., 2012. Colon cancer cells produce immunoregulatory glucocorticoids. *Oncotarget* 1, 529–530.
- Song, G., Li, Y., Jiang, G., 2012. Role of VEGF/VEGFR in the pathogenesis of leukemias and as treatment targets. *Oncol. Rep.* 28, 1935–1944 (Review).
- Song, M., Wang, H., Ye, Q., 2020. Increased circulating vascular endothelial growth factor in acute myeloid leukemia patients: a systematic review and meta-analysis. *Syst. Rev.* 9, 103.
- Strzyga-Lach, P., Chrzanowska, A., Podsadni, K., Bielenica, A., 2021. Investigation of the mechanisms of cytotoxic activity of 1,3-disubstituted thiourea derivatives. *Pharmaceuticals* 14, Basel, Switzerland.
- Sun, S., Zhang, J., Wang, N., Kong, X., Fu, F., Wang, H., Yao, J., 2018. Design and discovery of quinazoline- and thiourea-containing sorafenib analogs as EGFR and VEGFR-2 dual TK inhibitors. *Molecules* 23, 24.
- Sun, Y., Shan, Y., Li, C., Si, R., Pan, X., Wang, B., Zhang, J., 2017. Discovery of novel anti-angiogenesis agents. Part 8: diaryl thiourea bearing 1H-indazole-3-amine as multi-target RTKs inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 141, 373–385.
- Vene, R., Benelli, R., Minghelli, S., Astigiano, S., Tosetti, F., Ferrari, N., 2012. Xanthohumol impairs human prostate cancer cell growth and invasion and diminishes the incidence and progression of advanced tumors in TRAMP mice. *Mol. Med.* 18, 1292–1302.
- Wang, Q., Morris, R.J., Bode, A.M., Zhang, T., 2022. Prostaglandin pathways: opportunities for cancer prevention and therapy. *Cancer Res.* 82, 949–965.
- Watek, M., Durnas, B., Wollny, T., Pasiarski, M., Gozdz, S., Marzec, M., Chabowska, A., Wolak, P., Zendzian-Piotrowska, M., Bucki, R., 2017. Unexpected profile of sphingolipid contents in blood and bone marrow plasma collected from patients diagnosed with acute myeloid leukemia. *Lipids Health Dis.* 16, 235.
- Yan, M., Xu, Q., Zhang, P., Zhou, X.J., Zhang, Z.Y., Chen, W.T., 2010. Correlation of NF- κ B signal pathway with tumor metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 10, 437.
- Yu, B., Liu, Y., Peng, X., Hua, S., Zhou, G., Yan, K., Liu, Y., 2020. Synthesis, characterization, and antitumor properties of Au(I)-thiourea complexes. *Metallomics* 12, 104–113.
- Zhang, X., Luo, H., 2018. Effects of thalidomide on growth and VEGF-A expression in SW480 colon cancer cells. *Oncol. Lett.* 15, 3313–3320.
- Zhang, Y., Meng, X., Tang, H., Cheng, M., Yang, F., Xu, W., 2020. Design, synthesis, and biological evaluation of novel substituted thiourea derivatives as potential anticancer agents for NSCLC by blocking K-Ras protein-effectors interactions. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 35, 344–353.
- Zhang, Y.L., Wen, X.D., Guo, X., Huang, S.Q., Wang, T.T., Zhou, P.T., Li, W., Zhou, L.F., Hu, Y.H., 2021. Progesterone suppresses the progression of colonic carcinoma by increasing the activity of the GADD45 α /JNK/c-Jun signalling pathway. *Oncol. Rep.* 45.
- Zhou, M., Liu, X., Li, Z., Huang, Q., Li, F., Li, C.Y., 2018. Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *Int. J. Cancer* 143, 921–930.

FULL PAPER

Proapoptotic effects of halogenated bis-phenylthiourea derivatives in cancer cells

Paulina Strzyga-Łach¹  | Alicja Chrzanowska¹ | Ewelina Kiernożek-Kalińska² |
Barbara Żyżyńska-Granica¹ | Katarzyna Podsadni¹ | Piotr Podsadni³ |
Anna Bielenica¹ 

¹Chair and Department of Biochemistry, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

²Department of Immunology, Faculty of Biology, University of Warsaw, Warsaw, Poland

³Department of Drug Technology and Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

Correspondence

Anna Bielenica, Chair and Department of Biochemistry, Medical University of Warsaw, Warsaw 02-097, Poland.
Email: abielenica@wum.edu.pl

Funding information

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Abstract

New halogenated thiourea derivatives were synthesized via the reaction of substituted phenylisothiocyanates with aromatic amines. Their cytotoxic activity was examined in in vitro studies against solid tumors (SW480, SW620, PC3), a hematological malignance (K-562), and normal keratinocytes (HaCaT). Most of the compounds were more effective against SW480 (**1a**, **3a**, **3b**, **5j**), K-562 (**2b**, **3a**, **4a**), or PC3 (**5d**) cells than cisplatin, with favorable selectivity. Their anticancer mechanisms were studied by Annexin V-fluorescein-5-isothiocyanate apoptosis, caspase-3/caspase-7 assessment, cell cycle analysis, interleukin-6 (IL-6) release inhibition, and reactive oxygen species (ROS) generation assay. Thioureas **1a**, **2b**, **3a**, and **4a** were the most potent activators of early apoptosis in K-562 cells, and substances **1a**, **3b**, **5j** triggered late-apoptosis or necrosis in SW480 cells. This proapoptotic effect was proved by the significant increase of caspase-3/caspase-7 activation. Cell cycle analysis revealed that derivatives **1a**, **3a**, **5j** increased the number of SW480 and K-562 cells in the sub-G1 and/or G0/G1 phases, and one evoked cycle arrest at the G2 phase. The most potent thioureas inhibited IL-6 cytokine secretion from PC3 cells and both colon cancer cell lines. Apoptosis-inducing compounds also increased ROS production in all tumor cell cultures, which may enhance their anticancer properties.

KEYWORDS

apoptosis, caspase-3/caspase-7 activation, cell cycle analysis, cytotoxic activity, thiourea derivatives

1 | INTRODUCTION

Cancer is a leading cause of death worldwide, just after heart disease. According to the World Health Organization (WHO), among the different types of cancers, lung cancer is the most common, whereas prostate and colorectal cancers come in the next places. Moreover, breast cancer is the main cause of female deaths related to cancer globally.^[1]

The 1,3-disubstituted thiourea structural motif constitutes a useful framework of a variety of chemotherapeutics and bioactive agents exhibiting a broad range of pharmacological properties, such as antibacterial,^[2–6] antiviral,^[7,8] anticonvulsant,^[9,10] anti-inflammatory,^[4,11] antioxidant,^[12] or anticancer.^[13] Antitumor action of small molecules, such as diaryl(thio)ureas (Figure 1), can comprise several possible mechanisms. They can trigger apoptosis via either mitochondrial (intrinsic) or extracellular (extrinsic) pathways. The first route is activated

FIGURE 1 Examples of anticancer compounds containing urea or thiourea moieties.

thiourea derivatives, similarly to their thiazolidine analogs,^[19] are able to arrest cancerous cells in the pre-G1 phase,^[20,21] G0/G1 phase^[17,22] or induce cell apoptosis at the G2-M phase.^[20–24] Synthetic 1,3-phenyl bis-thiourea compounds cause cancer cell death by mitotic arrest in the prometaphase,^[25] whereas brominated diarylthioureas accumulate them in the S phase.^[26] These compounds cause visible morphological changes in cancer cell components, such as the plasma membrane, lysosomes, and mitochondria.^[27]

Human epidermal growth factor receptors (EGFR, also erbB or HER) play an important role in cell growth, differentiation, and angiogenesis. Targeting them by tyrosine kinase inhibitors (TKI) is another example of tumor-specific therapy. Several halogenated diphenylurea derivatives (sorafenib, linifanib) and their newly synthesized thiourea analogs have been recently described as inhibitors of the intracellular kinase domain of human epidermal growth factor receptor 2 in breast cancer cells^[28] or mutant EGFR inhibitors in lung cancer cell lines.^[29] An inhibitory effect against two types of EGFR tyrosine kinases of HepG2 cells was observed for benzo[d][1,3]dioxol-5-yl thiourea derivatives.^[20,21] Hamed et al.^[30] developed fluorinated diarylthiourea derivatives that are dual suppressors of both EGFR kinase and the activity of nuclear-kappa B factor, a transcription factor induced by a cancer cell after treatment with HER inhibitors. Additionally, an overactivation of this factor is observed in inflammatory and autoimmune diseases.^[11] Substituted thiourea compounds have also been described in lung cancer cells as blockers of Ras kinase proteins of enzymes that are regulators of cell proliferation, differentiation, and survival.^[31] Antiangiogenic properties of ureas/thioureas were demonstrated by selective inhibition of tyrosine kinases in hepatocellular carcinoma,^[15] lung cancer,^[32] or vascular endothelial cells.^[33]

Anticancer agents can also act as inhibitors of other enzymes of different classes, such as hydrolases, oxidoreductases, or lyases, overexpressed in human tumors. Acridine (thio)urea compounds were reported to target the catalytic cycle of topoisomerases I and II, responsible for the decatenation and relaxation of supercoiled DNA.^[34] Pyrimidine acyl thioureas described by Koca et al.^[35] block the ATP binding site of heat shock protein Hsp90 of invasive breast cancers and their bone metastasis. Besides, pyrimidine-thiourea hybrids suppressed the gene expression of histone lysine demethylase 1 (LSD 1) in gastric cancer cells.^[36] On the other hand, carbonic anhydrase providing bicarbonate for the synthesis of nucleotides and membrane lipids in cancer cells, was inhibited by thioureido benzenesulfonamide derivatives.^[37] Studies have shown that derivatives bearing the arylthiourea core are also known as direct DNA intercalators, such as ciprofloxacin-thiourea hybrids^[38] or a variety of acridinyl(thio)urea compounds.^[39] A variety of carbazole conjugates have been developed as potential anticancer agents,^[40–42] and among them urea-derived compounds possessed potent broad-spectrum activity against a variety of solid tumors, acting as human DNA topoisomerase II inhibitors and apoptosis-inducing agents.^[40]

Encouraged by our previous studies^[43] and prompted by findings of other researchers, in this work we designed and synthesized a structurally differential series of halogenated 1,3-bisphenylthioureas,

to select small molecules with apoptosis-inducing properties, able to induce caspases activity, increase the level of ROS and disturb the cell cycle in tumor cells.

2 | RESULTS AND DISCUSSION

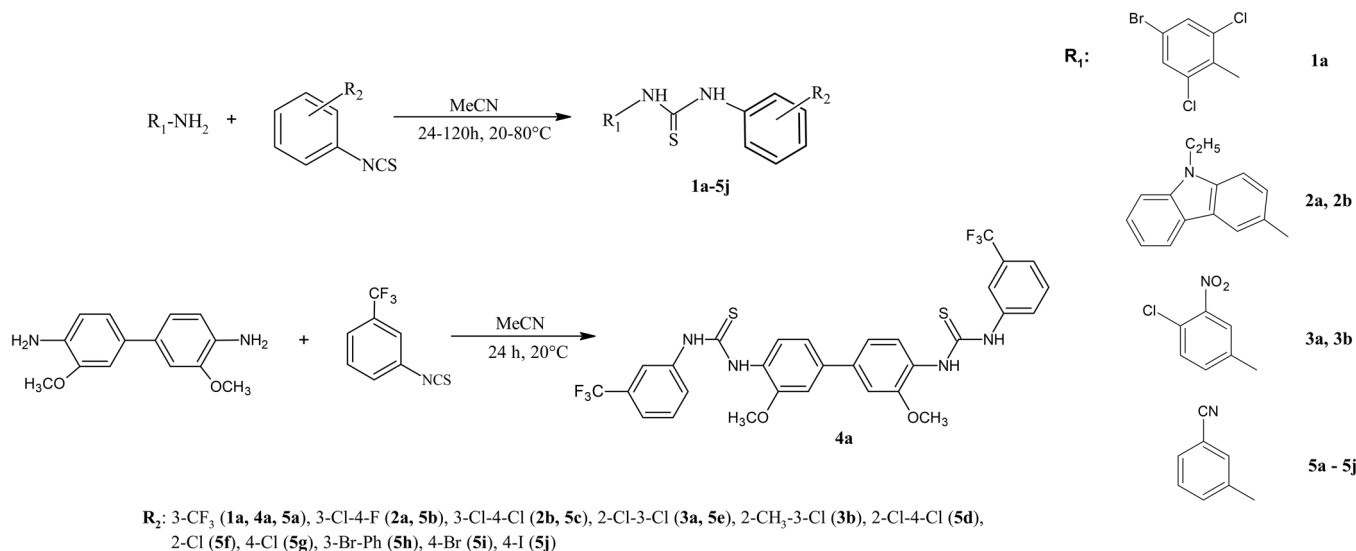
2.1 | Chemistry

A group of 16 new diphenylthiourea derivatives were synthesized by condensation of aromatic amines with substituted phenylisothiocyanates, according to the one-step reaction procedure indicated in our previous paper (Scheme 1).^[43] Our earlier investigations^[5,43,44] and conclusions of other authors^[15,16,22,23,26,30,31,35,37] pointed out that the biological activity of thiourea compounds is affected by the presence of strong (-NO₂, -CF₃, -CN) or weak (-F, -Cl, -Br, -I) electron-withdrawing functionalities (R₂) on terminal aromatic rings, as well as an electron-donating -OCH₃ group here.^[32–34,40] The choice of the size of amine rings (R₁)—mainly phenyl, but also bulky carbazolyl—was dictated by the high probability of finding potent derivatives among them.^[30,31,35,40,44] Therefore, the studies reported herein focused on various halogenated derivatives bearing aromatic amine nuclei of different size and substituents. The series was divided into subseries to highlight the differences in the structure of terminal amines, namely diarylthioureas: 4-bromo-2,6-dichlorophenyl (**1a**), 4-chloro-3-nitrophenyl (**3a**, **3b**), 3,3'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl] (**4a**) and 2-cyanophenyl (**5a–5j**) and heteroaromatic 9-ethyl-9H-carbazol-3-yl (**2a**, **2b**) derivatives. Tested analogs include both mono- (**1a**, **4a**, **5a**, **5f–5j**) and disubstituted (**2a**, **2b**, **3a**, **3b**, **5b–5e**) thioureas containing halogens, -CF₃, -NO₂, -OCH₃ or -CN groups. Among this diverse group, the presence of only one 4-bromo-2,6-dichlorophenyl derivative (**1a**) was a result of a weak reactivity of the starting amine and difficulties to carry out the synthesis. Compounds **3a**, **3b** expand the previously reported broad group of 4-chloro-3-nitrophenylthiourea derivatives with high cytotoxic properties.^[44] Inclusion of carbazolyl derivatives, reported as cytotoxic,^[40–42] was aimed to compare the biological properties of molecules bearing a condensed heterocyclic core (**2a**, **2b**) with biphenyl (**4a**) and smaller phenylthiourea (**1a**, **3a**, **3b**, **5a–5j**) derivatives. The formation of target compounds was confirmed by structural characterization techniques such as ¹H nuclear magnetic resonance (NMR), ¹³C NMR, and -high-resolution mass spectrometry (HRMS). Purity of novel compounds was established by high-performance liquid chromatography (HPLC) method and have met above 95% requirement for all of them.

2.2 | Biological studies

2.2.1 | Cytotoxic activity

The in vitro cytotoxic evaluation of the synthesized series **1a–5j** was investigated against five target cell lines: SW480 (primary colon cancer),



SCHEME 1 Synthesis of thiourea derivatives **1a–5j**.

SW620 (metastatic colon cancer), PC3 (metastatic prostate cancer), K-562 (chronic myelogenous leukemia), and normal HaCaT (immortalized human keratinocytes), by using the 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay (Table 1). Doxorubicin and cisplatin are some of the most effective anticancer drugs issued as positive controls. Among the studied thioureas, a group of seven compounds was active at $\leq 10 \mu M$ against at least one cancer cell line. The SW480 and K-562 cell cultures appeared to be the most sensitive to the presence of tested substances, whereas the PC3 line remained not very vulnerable. Numerous thioureas were even more effective against SW480 (**1a**, **3a**, **3b**, **5j**), K-562 (**2b**, **3a**, **4a**), or PC3 (**5d**) cell lines than the reference cisplatin, with generally severalfold more beneficial SI and lower inhibitory concentrations (IC_{50}). The most versatile derivative **1a** inhibited the growth of both colon tumor and K-562 cells at an IC_{50} ranging from 4.4 to $10.7 \mu M$, with adequate selectivity indexes (7.3–17.7). Similarly, the thiourea **3a** was potent toward all three cancerous cell lines at 7.6 – $9.7 \mu M$. Structural analogs of these compounds, that is, derivatives **2b** and **4a** displayed selective cytotoxic action against K-562 leukemia cells at the same concentration level (7.6 – $7.9 \mu M$). Moreover, other halogenated thiourea compounds revealed their anticancer potency, particularly toward SW480 (**3b**, **5j**) or PC3 (**5d**) cells at the concentration range 7.9 – $10.5 \mu M$. Selectivity indexes of derivatives mentioned above ranged from 2.5 (**3b**) to 12.7 (**5j**). The rest of the investigated compounds possessed moderate cytotoxic effects, mainly anti-leukemia (**3b**, **5d**, **5h**) and anticolon carcinoma (**3b**, **5a**), with IC_{50} from 13.2 to $19.8 \mu M$. The most favorable drug candidates were weakly (**1a**, **5j**) or moderately (**2b**, **3b**, **4a**, **5d**) cytotoxic against the HaCaT cell line, incomparably less than the reference chemotherapeutics. The SI values of these compounds applied at their IC_{50} ranged from 2.4 to 17.7 and were higher than estimated for the reference drugs (SI from 0.4 to 1.5). The derivative **3a** was the most cytotoxic toward normal keratinocytes, with selectivity indexes varying from 1.5 to 1.9.

2.2.2 | Structure–activity relationship

A variety of terminal rings linked with a thiourea branch and electron-negative functionalities attached to phenyl moieties allowed to analyze their impact on cytotoxic properties. The study of structure–activity relationship of the new thiourea derivatives is presented in Figure 2. According to our investigations, the phenylamine-derived part of a thiourea structure (R_1) was the most crucial aspect of its biological activity. Compounds containing 4-bromo-2,6-dichloro- (**1a**) and 4-chloro-3-nitrophenyl (**3a**, **3b**) nuclei constituted the most cytotoxic group, active against three cancer cell lines. When the cyano group was inserted into the phenyl ring at the place of halogen atoms, the cytotoxic properties of a corresponding thiourea derivative have visibly diminished (**1a** $\rightarrow$ **5a**, **3a** $\rightarrow$ **5e**, **2b** $\rightarrow$ **5c**), except from 2-chloro-4-chloro- (**5d**) and 3-bromophenyl (**5h**) derivatives, effective against PC3 and K-562 cells. On the other hand, the replacement of bromine (**5i**) to iodine (**5j**) on *para*-position of the benzene ring resulted in increased cytotoxicity against SW480 cells. The expansion of phenyl to 9-ethyl-9H-carbazol-3-yl moiety led to decreased activity (**2a**). However, the high cytotoxicity against K-562 cells was observed when the fluorine atom (**2a**) was replaced by chlorine (**2b**).

Additionally, considering the second terminal moiety, disubstituted derivatives with at least one chlorine atom (**2b**, **3a**, **3b**, **5d**), as well as *meta*- CF_3 -substituted analogs (**1**) revealed distinct cytotoxic effects. The **4a** revealed distinct cytotoxic effects. The presence of a 3- CF_3 group promoted the cytotoxic activity toward K-562 (**1a**, **4a**, **5a**) and SW480/SW620 cells (**1a**, **5a**), with a high SI over normal cells. Comparing monohalogenophenyl analogs, an increase in cytotoxicity against SW480 cells for 4-iodophenyl (**5j**) and toward PC3/K-562 lines for 3-bromophenyl compounds (**5h**) was noticed. Derivatives bearing chlorine or bromine functionalities in other positions on the aromatic ring were weakly potent. For 2-cyanophenyl analogs, an introduction of chlorine or bromine instead of the iodide atom led to a gradual change in cytotoxic

TABLE 1 Cytotoxic activity (IC₅₀, μM) and lipophilicity (iLogP) of studied compounds estimated by the MTT assay.^a

Compound	R ₂	Cancer cells								Normal cells	
		SW480 ^b		SW620 ^e		PC3 ^f		K-562 ^g		HaCaT ^h	iLogP ⁱ
		IC ₅₀ ^c	SI ^d	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	
1a	3-CF ₃	4.4 ± 1.1	17.7	9.1 ± 0.8	8.5	>100	0.8	10.7 ± 0.3	7.3	77.8 ± 8.2	3.45
2a	3-Cl-4-F	53.1 ± 0.7	0.4	59.8 ± 13.6	0.4	36.9 ± 0.5	0.6	53.9 ± 9.0	0.4	23.4 ± 4.2	3.24
2b	3-Cl-4-Cl	45.9 ± 2.9	0.5	27.2 ± 4.3	0.9	>100	0.2	7.6 ± 2.4	3.3	25.2 ± 3.2	3.37
3a	2-Cl-3-Cl	9.7 ± 0.7	1.5	7.6 ± 0.6	1.9	24.9 ± 3.2	0.6	7.8 ± 2.2	1.9	14.6 ± 4.8	2.57
3b	2-CH ₃ -3-Cl	9.0 ± 0.5	2.5	19.8 ± 0.9	1.1	40.5 ± 1.1	0.6	15.2 ± 3.0	1.5	22.6 ± 5.0	3.96
4a	3-CF ₃	37.2 ± 0.1	1.4	30.4 ± 3.9	1.8	79.3 ± 5.2	0.7	7.9 ± 0.4	6.8	53.8 ± 5.2	4.19
5a	3-CF ₃	38.2 ± 6.2	2.6	13.2 ± 0.1	7.6	45.8 ± 4.1	2.2	26.3 ± 1.7	3.8	>100	2.42
5b	3-Cl-4-F	26.9 ± 2.7	3.7	45.2 ± 2.6	2.2	>100	1.0	40.5 ± 5.2	2.5	>100	2.37
5c	3-Cl-4-Cl	>100	1.0	>100	1.0	23.8 ± 0.6	4.2	83.2 ± 9.3	1.2	>100	2.51
5d	2-Cl-4-Cl	>100	0.4	>100	0.4	10.5 ± 1.2	3.5	14.1 ± 4.2	2.6	37.1 ± 4.1	2.69
5e	2-Cl-3-Cl	24.9 ± 5.3	4.0	>100	1.0	>100	1.0	22.3 ± 1.8	4.5	>100	2.62
5f	2-Cl	56.3 ± 8.8	0.5	>100	0.3	>100	0.3	31.8 ± 5.1	0.9	29.8 ± 2.3	2.54
5g	4-Cl	>100	1.0	66.2 ± 2.2	1.5	>100	1.0	44.1 ± 5.1	2.3	>100	2.44
5h	3-Br	>100	1.0	>100	1.0	14.2 ± 2.0	7.0	16.9 ± 6.2	5.9	>100	2.49
5i	4-Br	>100	1.0	>100	1.0	>100	1.0	63.8 ± 4.4	1.6	>100	2.55
5j	4-I	7.9 ± 3.2	12.7	53.1 ± 1.0	1.9	81.7 ± 4.2	1.2	47.7 ± 1.2	2.1	>100	2.52
Doxorubicin ^j	-	0.75 ± 0.1	0.4	0.3 ± 0.1	1.0	0.3 ± 0.1	1.0	0.2 ± 0.1	1.5	0.3 ± 0.1	-
Cisplatin ^k	-	10.4 ± 0.9	0.6	6.7 ± 1.1	0.9	13.2 ± 2.1	0.5	8.2 ± 4.1	0.8	6.3 ± 0.7	-

^aData are expressed as mean SD.^bHuman primary colon cancer (SW480).^cIC₅₀ (μM)—the half-maximal growth inhibitory concentration after cultured the cells for 72 h with the individual compound.^dThe SI (Selectivity Index) was calculated using the formula: SI = IC₅₀ for normal cell line/IC₅₀ cancer cell line.^eHuman metastatic colon cancer (SW620).^fHuman metastatic prostate cancer (PC3).^gHuman chronic myelogenous leukemia (K562).^hHuman immortal keratinocyte cell line from adult human skin (HaCaT).ⁱiLogP—calculated on <http://www.swissadme.ch/>.^jThe reference compounds.^kThe reference compounds.

properties (5j > 5f > 5h for SW480 and 5h > 5f > 5j for K-562 cell line). Considering disubstituted chlorophenyl-derived thioureas, the presence of the 2,3-dichlorophenyl moiety (3a) gave the highest activity against three cell lines. Additionally, comparing terminal fragments of dichlorophenyl isomers 5c–5e, the activity against K-562 cell line was found to decrease as follows: 2,4-dichloro- >> 2,3-dichloro- > 3,4-dichlorophenyl.

It is assumed that the ideal lipophilicity range for passive membrane permeability is between 0 and 3, followed by the more lipophilic range between 3 and 5.^[45] The lipophilicities of strongly active thiourea derivatives, expressed as iLogP values, ranged from 2.57 to 4.19, reaching the optimal value of 3.45 for the most powerful trihalogenophenyl compound 1a. When compared, iLogP factors of all weakly potent 2-cyanophenylthioureas were lower and varied from 2.37 to 2.62.

2.2.3 | Activation of apoptosis

The thiourea-derived compounds (1a, 2b, 3a, 3b, 4a, 5d, 5j) with encouraging cytotoxic potential toward cancer cell lines at concentrations not higher than 10 μM, were chosen for further studies of their mechanisms of biological action. Their ability to induce apoptosis or necrosis in cancer and normal cells was assessed by flow cytometry analysis. As shown in Figures 3 and 4; Supporting Information: Table 1S, the studied derivatives applied at their IC₅₀ concentration revealed proapoptotic properties in selected cell lines, as compared with controls. That effect was the most spectacular in K-562 cells. Halogenated compounds 1a and 3a were the most potent inducers of early apoptosis in K-562 cells, as they promoted this process in 82.8% and 89.2% of cells, respectively. The

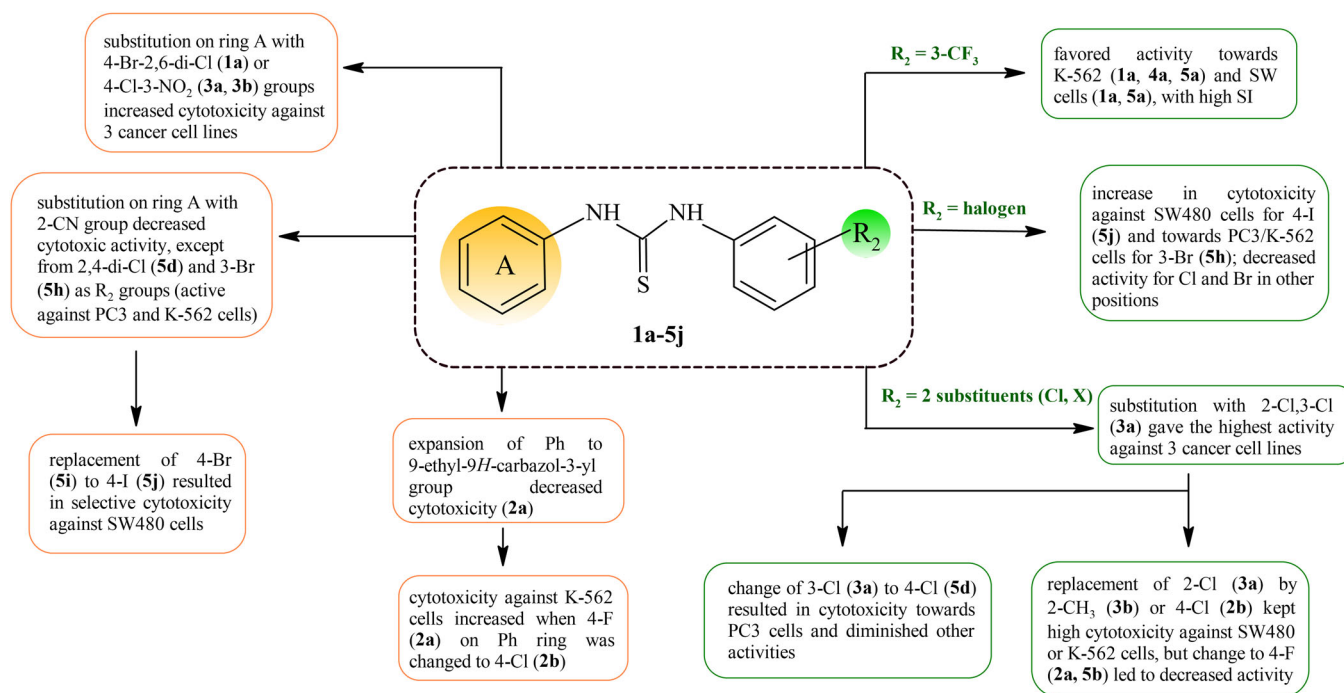


FIGURE 2 SAR of cytotoxicity of the new compounds **1a–5j**.

dichlorophenyl thiourea **2b** increased the percentage of early apoptotic leukemia cells up to 40.9%, promoting also late apoptosis effects in 12% of cells. The compound **4a** acted similarly, as it activated not only early, but also late apoptosis in K-562 cells, which accounted for 34.3% and 14.7%, respectively.

On the other hand, the dichlorophenyl analog **5d** considerably promoted the process of late apoptosis in 36.2% of PC3 cells. However, its impact on early apoptosis (13.5% of these cells) as well as on necrosis (14.4%) was also noticeable. Additionally, our studies exposed an elevated number (20.4%) of colon SW480 cells at the necrotic stage after treatment with the most active derivative **1a**. That compound was also a weak inducer of early apoptotic processes (in 11.8%) in this cell line. The thiourea-derived compounds **5j** and **3b** increased the percentage of necrotic SW480 cells up to 10.9%–9.5%, with negligible impact on apoptosis. As proved, the evaluated compounds weakly induced cell death via apoptosis/necrosis in metastatic SW620 cells.

It is worth noting that the investigated thiourea derivatives did not trigger apoptotic processes in normal HaCaT cells. Treatment of normal keratinocytes with the studied antitumor agents revealed $\geq 96\%$ live cell of the total cell number, comparing to control.

2.2.4 | Induction of caspase activity

It is widely acknowledged that caspase family proteins play crucial roles in the regulation of apoptosis processes. Among them, caspase-3 and caspase-7 are executors in the mitochondrial apoptosis pathways, degrading different regulatory and structural proteins. To estimate

whether the proapoptotic mechanism of the most potent thioureas (**1a**, **2b**, **3a**, **4a**, **5d**, **5j**) is associated with a stimulation of caspases, their effect on caspase 3 and caspase-7 was evaluated. Enzymatic activity was measured by the caspase Glo-3/7 assay in PC3, K-562, SW480, and HaCaT cell lines, treated with half-maximal IC_{50} of compounds at different time intervals (Figure 5; Supporting Information: Table 2S).

The measurement of caspase activities implied that all tested derivatives triggered apoptosis via a caspase-dependent pathway. As shown, all cancer cells exposed to the studied compounds presented a significant rise in the activity of caspase-3 and caspase-7. It is consistent to the proapoptotic properties of thioureas marked in the previous paragraph. The highest increase in these enzyme levels was denoted in SW480 cells in the presence of the derivative **1a**, by 379% after 12 h of incubation. As compared to the control, the activity changed to 285% and 140% after 24 and 48 h of the experiment, respectively. The analog **5j** caused a weaker activation of caspases in these cells after 24 h of treatment (by 31%), reaching the maximum after 48 h (by 137%).

All tested substances strongly increased caspase-3/caspase-7 activity in leukemia K-562 cells, especially after 24 h of the experiment. Compounds **1a** and **3a** resulted in a 270%–263% raise, while thiourea **2b** activated the enzymes by 63%, comparing with a control probe. The impact of compound **4a** on leukemia caspases was noticeable just after 12 h of the treatment (increase by 49%), and after longer incubation time the increase reached the level of 75%.

In PC3 cells exposed for 24 h to the thiourea **5d**, a rise in executional caspases activity by 277% was observed. Caspases stimulation was remarkable also after 12 h and remained after 48 h of the experiment, when it accounted for 39–32%.

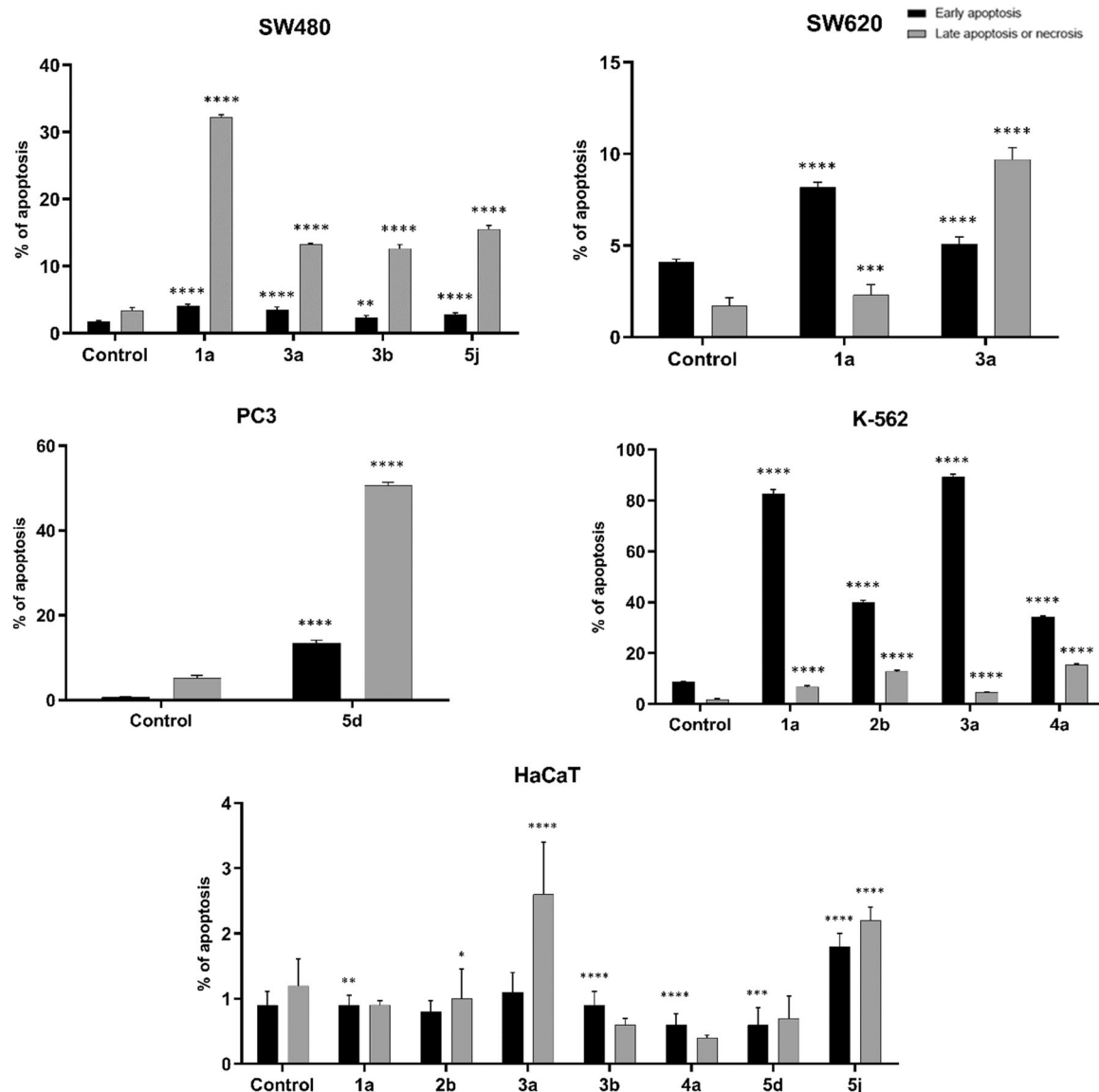


FIGURE 3 The effect of selected compounds on early and late apoptosis or necrosis in SW480 (primary colon cancer), SW620 (metastatic colon cancer), PC3 (metastatic prostate cancer), K-562 (chronic myelogenous leukemia), and HaCaT (immortal keratinocyte cell line from adult human skin) cells. **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$ as compared to the control.

The caspase stimulation in HaCaT cells incubated with the studied thiourea derivatives was comparable to control cells in all time frames. Other in vitro studies on the thiourea derivatives showed similar proapoptotic mechanisms through activation of caspase-3 or by rapid release of ROS, disruption of the mitochondrial membrane potential (MMP) and cytochrome-c liberation, and then the activation of caspase-3, caspase-7, and caspase-9.^[16,24]

2.2.5 | Cell cycle analysis

Dysregulation of a variety of cellular pathways, in particular those involved in the regulation of cell cycle machinery and apoptosis, is observed in several types of cancer. Subsequently, tumor cells may

escape apoptosis or senescence and show excessive proliferation and tumor growth. Some established chemotherapies and radiation may interfere with tumor growth by affecting cell cycle control and promoting apoptosis. Hence, therapeutic strategies targeting the underlying molecular machinery may have considerable potential.^[46]

To examine whether the effect of studied thioureas on cancer cells proliferation was associated with cell cycle changes, PI-metric cell cycle analysis by flow cytometry was conducted (Figure 6). Cells were incubated at the presence of IC₅₀ concentrations of compounds 1a, 2b, 3a, 3b, 4a, 5d, and 5j for 24 h.

As observed, the derivative 5d increased the percentage of PC3 cells at the sub-G1 phase (from 1.35% to 10.87%) and slightly decreased them at the S phase. Upon treatment of SW480 cells with thioureas 1a and 5j, a significant increase in the quantity of apoptotic

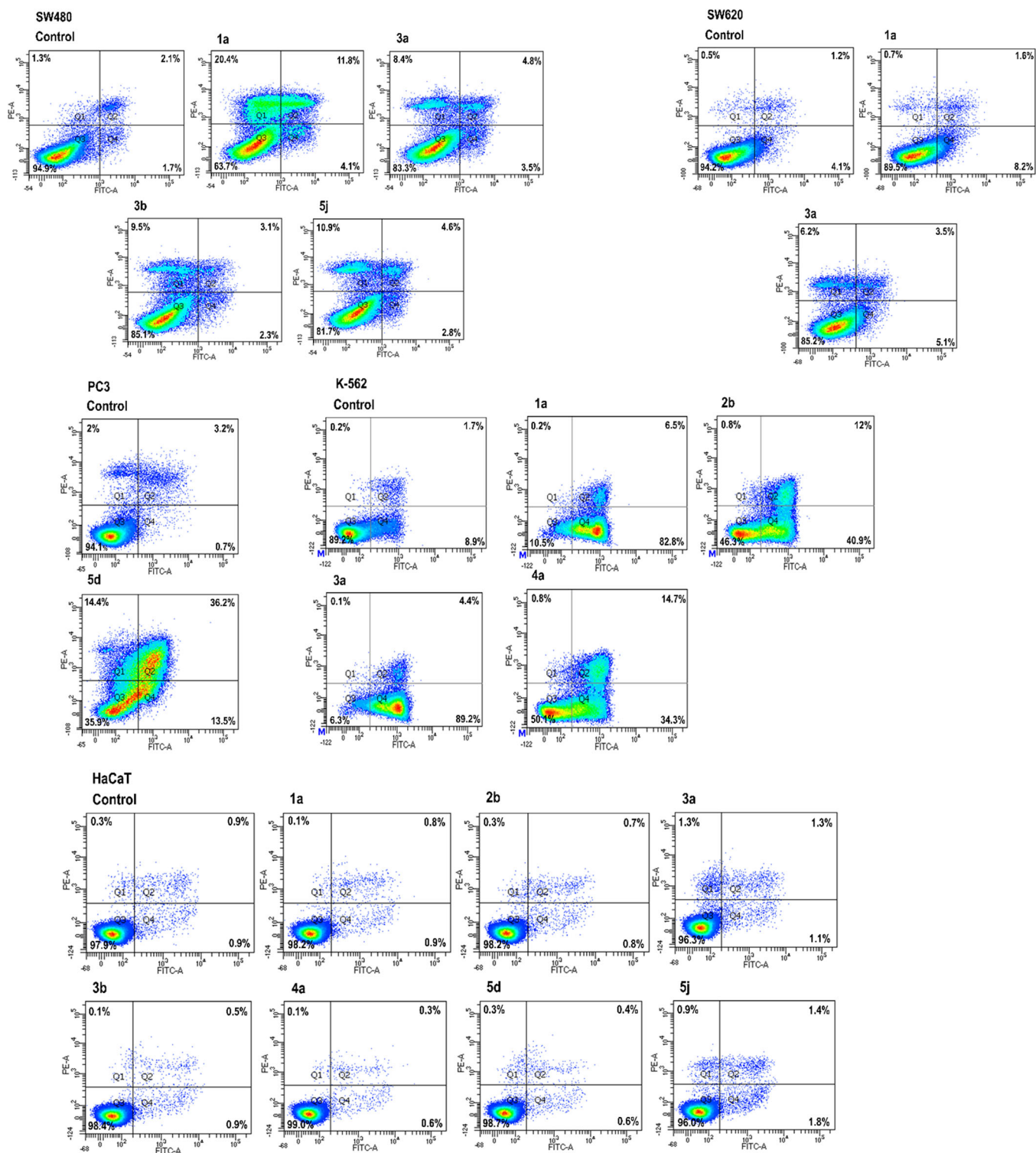


FIGURE 4 Representative results (%) as dot plots from apoptosis analysis of SW480, SW620, PC3, K-562 and HaCaT cells after treatment with selected compounds (1a, 2b, 3a, 3b, 4a, 5d, 5j) tested with flow cytometry. Q1, necrotic cells; Q2, late apoptotic cells; Q3, live cells; Q4, early apoptotic cells.

cells at the G0/G1 phase was denoted (to 75.27%–76.52%), as compared to control (56%). In addition, compound **1a** resulted in a six-fold increase of the cell amount at the sub-G1 phase. Moreover, both derivatives considerably reduced the number of cells accumulated at the S-phase and at the G2-phase. On exposure to substances

1a and **3a**, K-562 cells showed statistically significant growth at the sub-G1 phase (from 5.56% to 11.45% and 19.56%, respectively). The compound **2b** decreased leukemia cells at their G0/G1 phase, in contrast to the thiourea **3a**, that arrested the cell population at this phase. All studied compounds markedly affected the percentage of

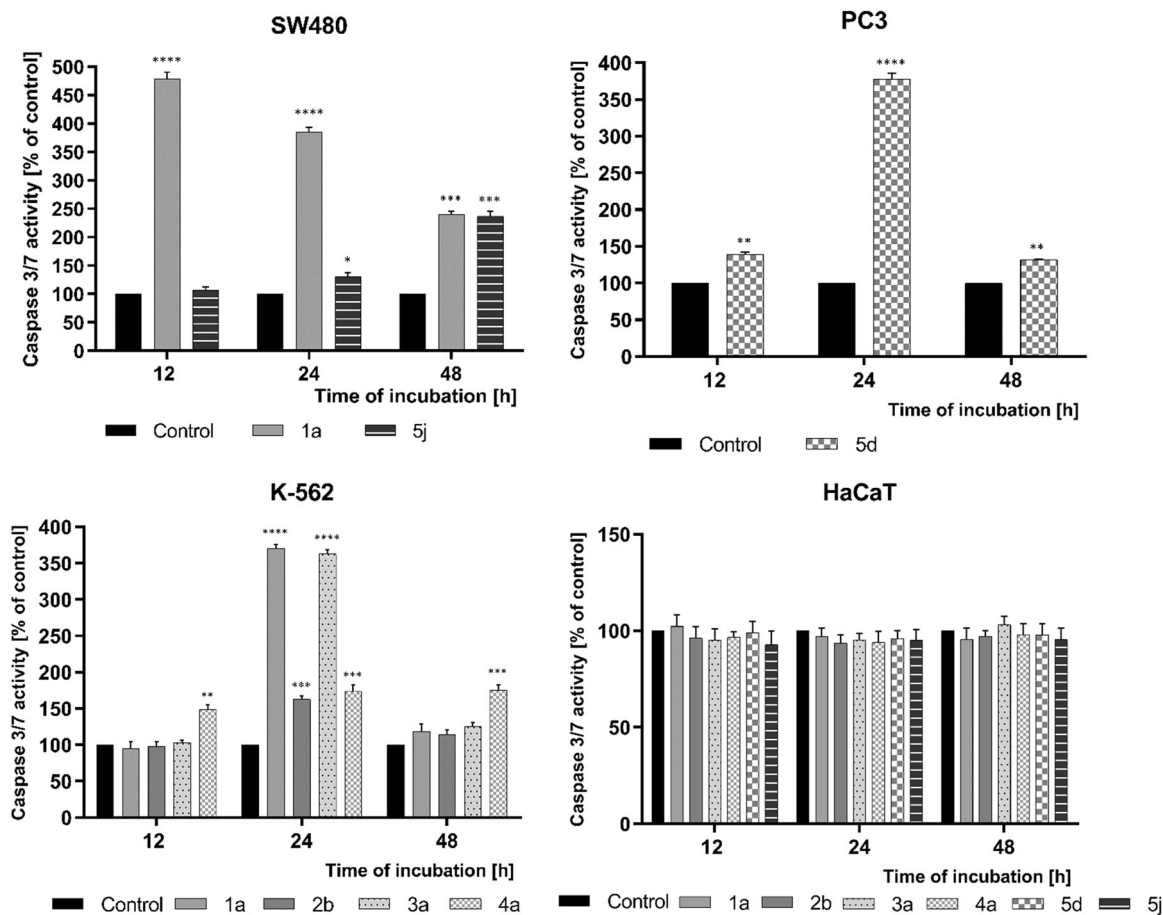


FIGURE 5 The effect of selected compounds on caspase-3/caspase-7 activity. Cells were incubated for 12, 24, or 48 h with the tested compounds used at their IC_{50} concentrations. Data are expressed as % of control and as the mean $\pm$ SD. **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$ as compared to the control.

K-562 cells at the G2 phase. There was a reduction in cell number upon treatment with thiourea-derived compounds **1a**, **3a**, and **4a**, while an increased cell accumulation was observed in the presence of the substance **2b**. Evaluated compounds applied at their IC_{50} concentrations had no significant impact on the cell cycle of normal keratinocytes, only the derivative **3a** slightly influenced the G0/G1 phase. The properties of the rest of the derivatives, that have insignificant impact on the cell cycle, were presented in Supporting Information: Figure 1s.

The above data indicated that the tested thioureas-induced cell cycle arrest in SW480 (**1a**, **5j**) and K562 (**3a**, **2b**) cells, what may result in the observed apoptosis in these cell lines. The compounds also have a cytotoxic effect against PC3 (**5d**), SW480 (**1a**), and K-562 (**1a**, **3a**) lines, as they greatly increased their population at the sub-G1 phase, which indicates apoptosis.

2.2.6 | Inhibition of interleukin-6 (IL-6) release

The principal function of cytokine IL-6 in cancer cells is the promotion of tumor development. The IL-6 induces target genes

involved in cancer cell survival, proliferation, angiogenesis, metastasis, or inflammation.^[47] An increased level of serum IL-6 is predictive for colorectal cancer growth with distant metastases and poor prognosis.^[48] In a search for a candidate IL-6 blocker within the synthesized series, particular cancer cells were tested at IC_{50} doses of derivatives **1a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4a**, **5d**, and **5j** (Figure 7; Supporting Information: Table 4S). A remarkable biological effect was denoted for all derivatives. The dichlorophenyl compound **3a** exhibited significant IL-6 inhibitory activity in both primary SW480 and metastatic SW620 colon cancer cells, with a 65% and 73% decrease of the cytokine level, respectively. Similar response (67% reduction) in SW480 cells was observed for the thiourea **5j**. However, the greatest impact was observed in metastatic PC3 cells for analog **5d**, which inhibited IL-6 secretion fivefold. The lower efficiency in studied colon tumor cell lines, at the level of 30%, was denoted for the thiourea **3b**. Interestingly, in HaCaT cells a slight concentration increase of this cytokine after treatment with **3a**, **4a**, and **5d** was observed. The role of IL-6 in normal tissue has a positive impact and can be helpful for, for example, muscle growth or for protection of skin cells from harmful environmental factors.^[49,50]

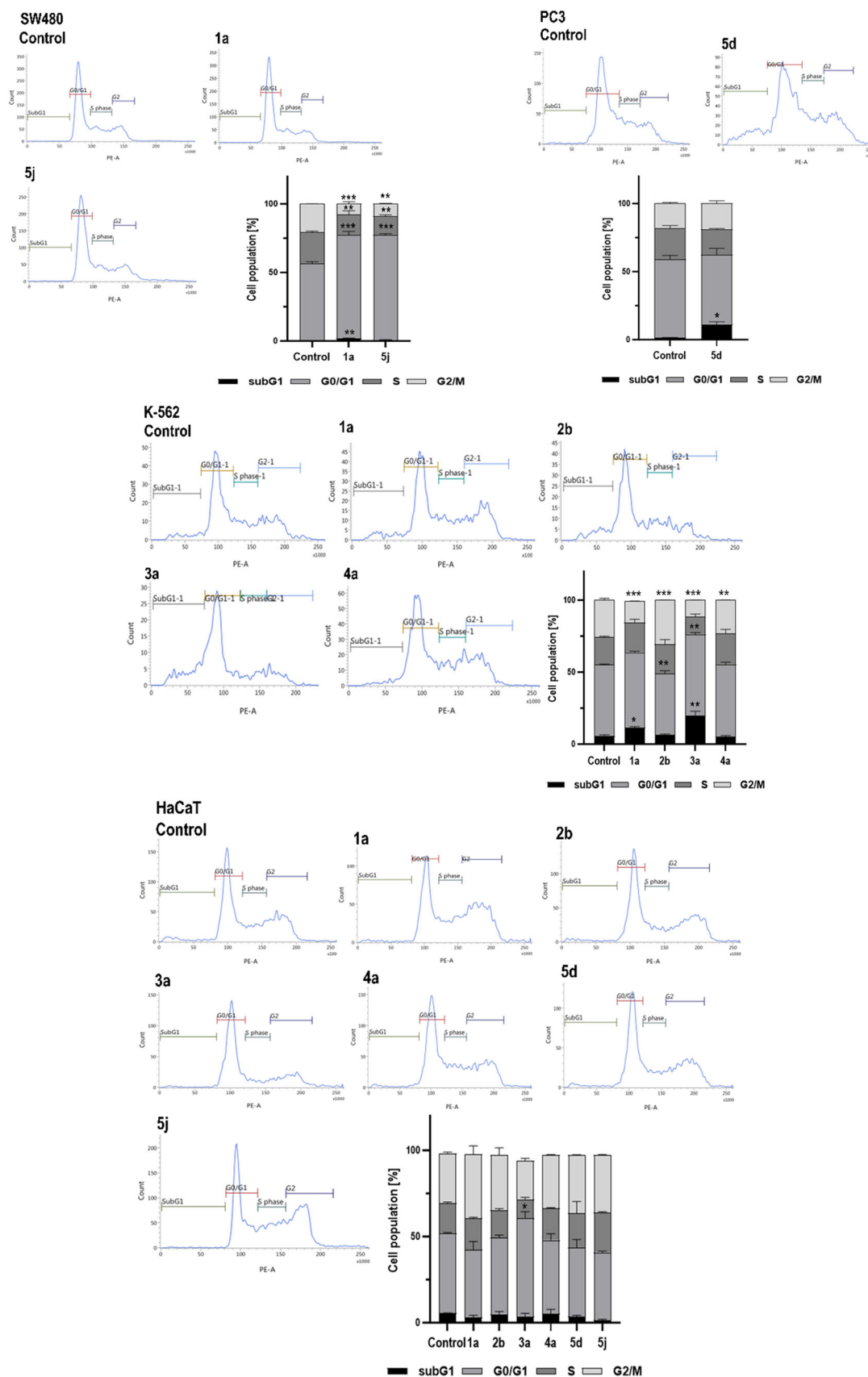


FIGURE 6 Flow cytometry analysis of cell cycle parameters after incubation of SW480, PC3, K-562 and HaCaT cells with selected compounds at their IC₅₀ concentration for 24 h *** $p < 0.001$; ** $p < 0.02$; * $p < 0.05$.

2.2.7 | ROS inducing activity

Numerous anticancer drugs can increase the cellular generation of ROS, by inducing an electron leakage (e.g., arsenic trioxide in leukemia cells), endoplasmic reticulum stress (celecoxib in prostate cancer), mitochondrial collapse (gamitrinib in prostate cancer) or by stimulating the p53 protein expression (5-fluorouracil in colon cancer).^[51] It has been shown that also complexed thiourea derivatives disturb the antioxidant and detoxifying system in cancer cells.^[13]

The capability of apoptosis-inducing compounds (**1a**, **3a**, **3b**, **4a**, **5d**, **5j**) to affect the H₂O₂ level in four cancerous cell cultures and HaCaT cell lines were studied. In general, the quantity of ROS measured after 2 h of incubation was comparable to controls, whereas clear differences in cellular H₂O₂ synthesis have been noticed after 12 h of the experiment, staying at similar levels up to 24 h (Figure 8; Supporting Information: Table S5). The increase of ROS levels in both colon SW480 and SW620 cells, treated for 24 h with derivatives **1a**, **3a**, and **5j**, was the highest. The thiourea **5j** increased the level of ROS in SW480 cell lines twofold, whereas the derivative **1a** in both mentioned cell cultures—by 63%–69%. The compound **3a** intensified ROS production in metastatic SW620 line stronger (by 68%) than in primary SW480 cells (43%). In addition,

between 12 and 24 h of the experiment, the derivative **3b** increased the ROS amount in SW480 cells by 30%. Similarly, the selected derivatives (**1a**, **3a**, **5d**) raised the level of H₂O₂ in both PC3 and K-562 cell lines by 29%–33% after 24 h. This elevated ROS production may lead to activation of apoptosis or necrosis in cancer cells. The intensity of ROS generation was the least pronounced in HaCaT (by 22%). This seems to be consistent with a weak induction of caspase-dependent apoptosis, low cytotoxicity observed in the MTT test, as well as no significant effect on the cell cycle.

3 | CONCLUSIONS

In summary, new hybrids containing halogenated 1,3-diphenyl and thiourea fragments have been synthesized. All the new derivatives were investigated for their cytotoxic activity against solid tumors (PC3, SW480, SW620), K-562 leukemia cells, and HaCaT keratinocytes. Compounds **1a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4a**, **5d**, **5j** showed the highest cytotoxic activities with a IC₅₀ range from 4.4 ± 1.1 to 10.7 ± 0.3 μM, stronger than cisplatin. Among them, the derivatives **3b**, **5j** were selectively potent toward SW480 cells, whereas **5d** against the PC3 cell line. Molecular mechanisms of cytotoxicity of the favorable compounds were examined. Thioureas-induced early apoptosis (**1a**,

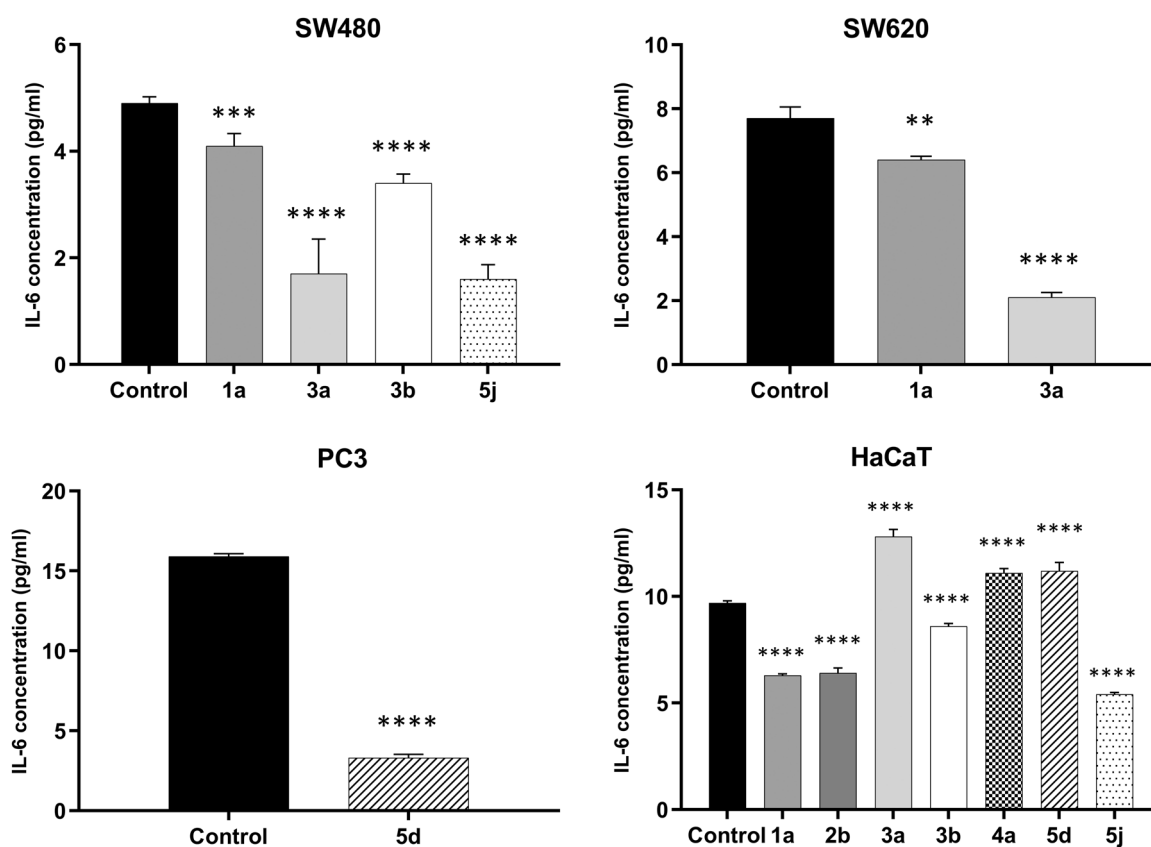


FIGURE 7 Effects of compounds **1a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4a**, **5d**, and **5j** on IL-6 levels, measured by the ELISA test. Data are expressed as the mean ±SD from primary colon cancer (SW480), metastatic colon cancer (SW620), metastatic prostate cancer (PC3) and immortal keratinocyte cell line from adult human skin (HaCaT). **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$ as compared to the control. ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IL-6, interleukin 6.

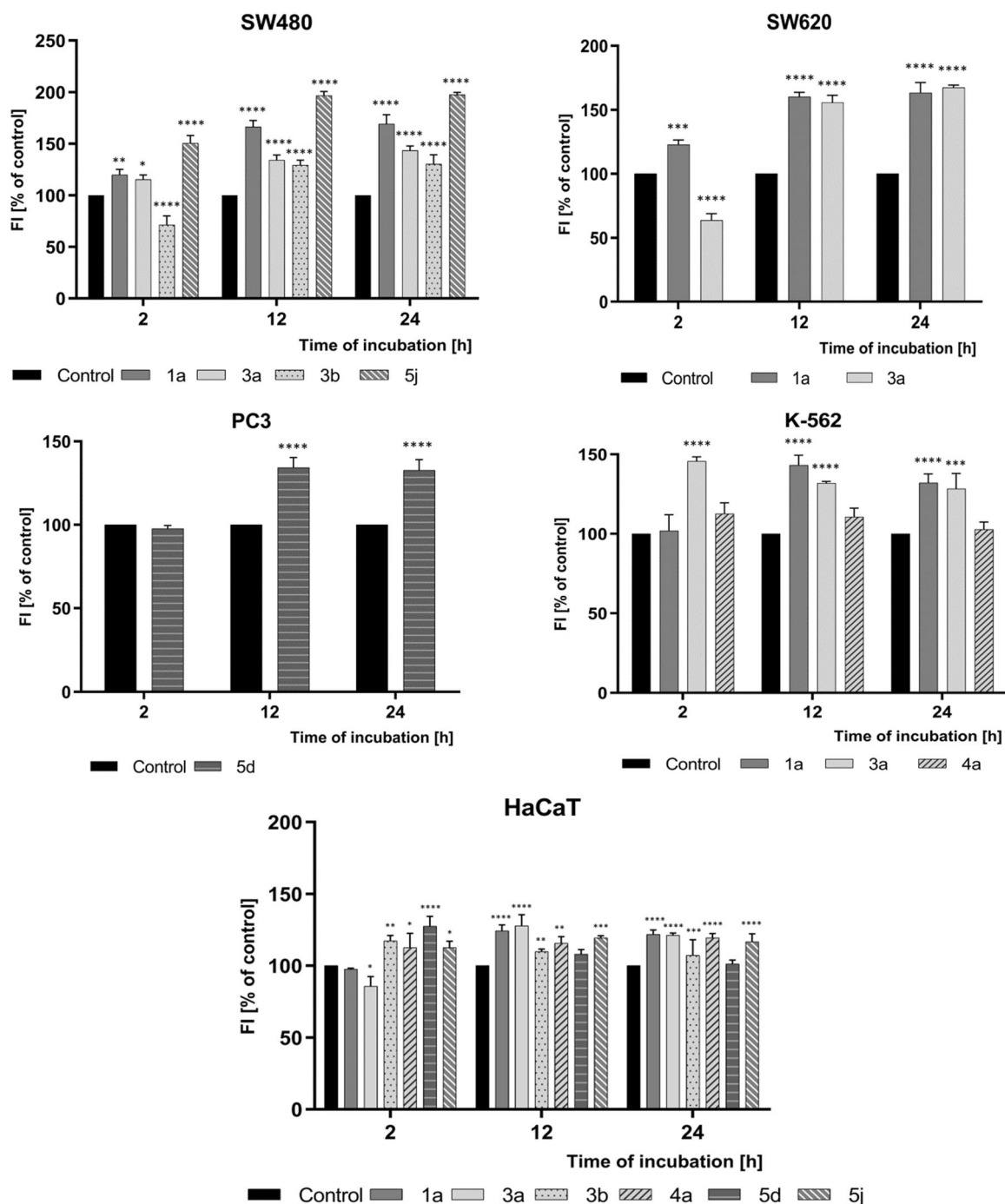


FIGURE 8 Effects of selected compounds on ROS production in SW480, SW620, PC3, K-562 and HaCaT cells. FI (fluorescence intensity) of the rhodamine (5 μ M) in the presence of selected compounds at their IC_{50} concentrations for 2, 12, and 24 h. **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$ as compared to the control.

2b, 3a, 4a) or late apoptosis/necrosis (1a, 5d, 5j), wherein the impact of compounds 1a and 3a on K-562 cells were of special interest in this regard. Proportionally to their proapoptotic properties, all substances induced effector caspase-3/caspase-7 in the studied cancer cells. Compounds 1a, 3a, and 5j increased the percentage of tumor cells at the sub-G1 and G0/G1 phases and diminished the cell population at S and G2 phases. In addition, the derivatives acted as IL-6 blockers in colon cancer (3a, 5j) and PC3 (5d) cells. Their

apoptosis-inducing potency could be also connected with significant ability to raise ROS levels, which together with the previously proven effect of reducing the antioxidant defense may increase the cytotoxic effect. The compounds displayed safety against the normal cell line. Thus, based on this study, dichlorophenyl derivative 3a, and monosubstituted phenylthioureas 1a and 5j are promising anticancer agents, shifting the cells toward undergoing apoptosis, which qualifies them as suitable candidates for further investigations.

4 | EXPERIMENTAL

4.1 | Chemistry

4.1.1 | General remarks

2-Aminobenzonitrile and 4-chloro-3-nitroaniline were supplied from Alfa Aesar; 4-bromo-2,6-dichloroaniline, 9-ethyl-9H-carbazol-3-amine and *o*-dianisidine (3,3'-dimethoxy[1,1'-biphenyl]-4,4'-diamine) were supplied from Sigma Aldrich. Isothiocyanates were purchased from Alfa Aesar or Sigma Aldrich. Acetonitrile, chloroform, and methanol were supplied from POCh (Polskie Odczynniki Chemiczne). All chemicals were of analytical grade and were used without any further purification. Prior to usage, acetonitrile was kept in crown cap bottles over anhydrous phosphorus pentoxide (Carl Roth). The NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE DMX400 spectrometer, operating at 300 MHz (^1H NMR) and 75.5 MHz (^{13}C NMR). The spectra were measured in dimethyl sulfoxide (DMSO) and are given as δ values (in ppm) relative to tetrametylsilan. Mass spectral electrospray ionization (ESI) measurements were carried out on LCT Micromass TOF HiRes apparatus. Flash chromatography was performed on Merck silica gel 60 (200–400 mesh) using chloroform–methanol mixture. Analytical thin layer chromatography was carried out on silica gel F254 (Merck) plates (0.25 mm thickness).

The InChI codes of the investigated compounds, together with some biological activity data, are provided as Supporting Information.

4.1.2 | General procedure for the preparation of 1,3-disubstituted thiourea derivatives (1a–5j)

A solution of commercially available aromatic amine (0.0031 mol) in anhydrous acetonitrile (5 mL) was treated with appropriate isothiocyanate (0.0031 mol). The mixture was stirred at room temperature for 6–12 h (derivatives **2a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4a**, **5a–5j**) or heated under reflux condenser for 48 h (compound **1a**). The solvent was then removed on a rotary evaporator, or the precipitated product was poured over a filter. The solid residue was crystallized from an appropriate solvent (methanol, chloroform) and/or purified by column chromatography (chloroform/methanol; 9.5:0.5 vol.).

The purity of the compounds established by RP-HPLC is given in Tables 6S and 7S.

1-(4-Bromo-2,6-dichlorophenyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea (**1a**)

Yield 10% (0.09 g), white powder, m.p. 160°C–162°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 9.86 (s, 1H), 9.37 (s, 1H), 7.84 (s, 2H), 7.73 (q, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.59–7.47 (m, 2H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 182.2, 136.2 (3C), 133.0, 132.0, 130.8, 127.7 (2C), 127.3, 126.3, 125.3, 121.6, 120.8. HRMS (ESI) calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{BrCl}_2\text{F}_3\text{N}_2\text{NaS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 464.8818, found: 464.8830.

1-(3-Chloro-4-fluorophenyl)-3-[9-ethyl-9H-carbazol-3-yl]thiourea (**2a**)

Yield 83% (0.63 g), yellow powder, m.p. 159°C–161°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 9.95 (s, 1H), 9.65 (s, 1H), 8.16–8.12 (m, 2H), 7.79 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 2.4$ Hz), 7.62–7.58 (m, 2H), 7.48–7.36 (m, 4H), 7.19 (t, 1H, $J = 7.35$ Hz), 4.45 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz), 1.32 (t, 3H, $J = 7.05$ Hz). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 180.6, 154.1 (d, $J_{\text{C-F}} = 224.0$ Hz), 139.9, 137.6, 137.0 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.2$ Hz), 130.2, 126.2, 125.9, 124.9 (d, $J_{\text{C-F}} = 7.1$ Hz), 124.2, 122.1, 122.0, 120.5, 118.7, 118.5 (d, $J_{\text{C-F}} = 18.6$ Hz), 117.6, 116.2 (d, $J_{\text{C-F}} = 21.7$ Hz), 109.2, 109.0, 37.0, 13.7. HRMS (ESI) calc. for $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{ClFN}_3\text{NaS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 420.0713, found: 420.0726.

1-(3,4-Dichlorophenyl)-3-[9-ethyl-9H-carbazol-3-yl]thiourea (**2b**)

Yield 77% (0.61 g), yellowish powder, m.p. 169°C–171°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 10.06 (s, 1H), 9.79 (s, 1H), 8.16–8.13 (m, 2H), 7.94 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 7.61–7.55 (m, 3H), 7.51 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 7.49–7.42 (m, 2H), 7.22–7.17 (m, 1H), 4.44 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz), 1.32 (t, 3H, $J = 7.05$ Hz). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 180.3, 140.1, 139.9, 137.6, 130.3, 130.2, 129.9, 125.9, 125.8, 125.1, 124.1, 123.8, 122.1, 122.0, 120.5, 118.8, 117.5, 109.2, 109.0, 37.0, 13.7. HRMS (ESI) calc. for $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{S}$ $[\text{M-H}]^-$: 412.0442, found: 412.0455.

1-(4-Chloro-3-nitrophenyl)-3-[2,3-dichlorophenyl]thiourea (**3a**)

Yield 75% (0.82 g), pale yellow powder, m.p. 144°C–146°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 10.38 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 8.39 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 7.85 (dd, 1H, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz), 7.75–7.71 (m, 1H), 7.59–7.51 (m, 2H), 7.42–7.37 (m, 1H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 180.6, 146.8, 139.4, 139.2, 137.9, 131.9, 131.4, 129.5, 128.7, 128.6, 128.5, 127.9, 119.9. HRMS (ESI) calc. for $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_3\text{N}_3\text{NaO}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 397.9301, found: 397.9289.

1-(2-Chloro-3-methylphenyl)-3-[4-chloro-3-nitrophenyl]thiourea (**3b**)

Yield 65% (0.67 g), pale yellow powder, m.p. 149°C–151°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 10.10 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 8.36 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 7.83 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 2.7$ Hz), 7.71–7.68 (m, 1H), 7.41–7.38 (m, 1H), 7.26–7.24 (m, 2H), 2.26 (s, 3H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 180.7, 146.8, 139.7, 138.8, 133.9, 133.5, 131.2, 128.6, 127.7, 127.2, 127.1, 119.9, 119.6, 15.3. HRMS (ESI) calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M-H}]^-$: 353.9871, found: 353.9867.

1,1'-(3,3'-Dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea) (**4a**)

Yield 88% (0.70 g), gray powder, m.p. 177°C–179°C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ : 10.23 (s, 2H), 9.50 (m, 2H), 8.12 (m, 2H), 7.95 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 7.81 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 7.57 (t, 2H, $J = 7.8$ Hz), 7.48–7.45 (m, 2H), 7.37 (d, 2H, $J = 1.8$ Hz), 7.31 (dd, 2H, $J_1 = J_2 = 1.8$ Hz), 3.97 (s, 6H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ : 179.4 (2C), 152.3 (2C), 140.4 (2C), 138.0 (2C), 129.5 (2C), 128.7 (2C), 127.0 (2C), 126.7 (2C), 126.2 (2C), 122.3 (2C), 120.5 (2C), 119.6 (2C), 118.3 (2C),

109.9 (2C), 55.9 (2C). HRMS (ESI) calc. for $C_{30}H_{23}F_6N_4O_2S_2$ [M-H]⁻: 649.1167, found: 649.1179.

1-(2-Cyanophenyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea (5a)

Yield 50% (0.55 g), pale yellow solid, m.p. 259°C–261°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 12.84 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 8.40–8.32 (m, 3H), 7.74 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.65 (t, 1H, *J* = 7.95 Hz), 7.53–7.50 (m, 1H), 7.46–7.36 (m, 2H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 180.2, 154.5, 141.4, 139.3, 134.7, 129.9, 129.5, 126.4, 125.9, 123.7, 122.3, 120.7, 119.0, 115.7, 110.1. HRMS (ESI) calc. for $C_{15}H_9F_3N_3S$ [M-H]⁻: 320.0469, found: 320.0460.

1-(3-Chloro-4-fluorophenyl)-3-[2-cyanophenyl]thiourea (5b)

Yield 45% (0.47 g), white solid, m.p. 275°C–277°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 12.41 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 8.10 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.63–7.54 (m, 3H), 7.33–7.22 (m, 3H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 174.9, 155.1, 136.3, 133.4 (2C), 131.9, 130.7, 126.2 (2C), 123.9 (3C), 117.1, 115.6. HRMS (ESI) calc. for $C_{14}H_8ClFN_3S$ [M-H]⁻: 304.0112, found: 304.0105.

1-(2-Cyanophenyl)-3-[3,4-dichlorophenyl]thiourea (5c)

Yield 77% (0.84 g), creamy powder, m.p. 260°C–262°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 12.41 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 8.10 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 7.76–7.74 (m, 1H), 7.65–7.57 (m, 2H), 7.33–7.22 (m, 3H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 174.7, 140.4, 136.2, 133.4, 131.9 (2C), 131.1, 130.3 (2C), 126.2 (2C), 124.0 (2C), 115.7. HRMS (ESI) calc. for $C_{14}H_8Cl_2N_3S$ [M-H]⁻: 319.9816, found: 319.9827.

1-(2-Cyanophenyl)-3-[2,4-dichlorophenyl]thiourea (5d)

Yield 74% (1.0 g), pale yellow powder, m.p. 278°C–280°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 12.47 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 8.13 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.76 (m, 1H), 7.64–7.59 (m, 1H), 7.52–7.47 (m, 2H), 7.34–7.24 (m, 2H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 174.3, 154.1, 137.9, 136.0, 133.6 (2C), 133.0, 129.2, 128.1, 126.3 (2C), 124.2 (2C), 115.8. HRMS (ESI) calc. for $C_{14}H_8Cl_2N_3S$ [M-H]⁻: 319.9816, found: 319.9827.

1-(2-Cyanophenyl)-3-[2,3-dichlorophenyl]thiourea (5e)

Yield 66% (0.89 g), white solid, m.p. 290°C–292°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 12.48 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 8.14 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.65–7.59 (m, 2H), 7.43 (m, 2H), 7.35–7.24 (m, 2H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 174.2, 154.0, 140.6, 135.9, 133.6, 131.9, 130.4, 129.7, 128.4, 126.2, 124.2 (2C), 115.9, 114.8. HRMS (ESI) calc. for $C_{14}H_8Cl_2N_3S$ [M-H]⁻: 319.9816, found: 319.9827.

1-(2-Chlorophenyl)-3-[2-cyanophenyl]thiourea (5f)

Yield 59% (0.57 g), white solid, m.p. 256°C–258°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 12.42 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 8.12 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.64–7.32 (m, 6H), 7.29–7.23 (m, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 174.4, 154.2, 149.6, 147.9, 138.8, 136.0, 133.5, 131.7, 130.6, 129.3, 127.8, 126.3, 124.1, 115.7. HRMS (ESI) calc. for $C_{14}H_9ClN_3S$ [M-H]⁻: 286.0206, found: 286.0217.

1-(4-Chlorophenyl)-3-[2-cyanophenyl]thiourea (5g)

Yield 89% (1.08 g), yellow solid, m.p. 242°C–244°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 12.40 (m, 1H), 9.23 (m, 1H), 8.10 (dd, 1H, *J*₁ = *J*₂ = 1.2 Hz), 7.63–7.58 (m, 3H), 7.33–7.22 (m, 4H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 175.2, 136.8, 133.9 (2C), 133.5, 132.0 (3C), 130.1, 126.7 (2C), 124.5 (2C), 116.2. HRMS (ESI) calc. for $C_{14}H_9ClN_3S$ [M-H]⁻: 286.0206, found: 286.0217.

1-(3-Bromophenyl)-3-[2-cyanophenyl]thiourea (5h)

Yield 55% (0.61 g), creamy powder, m.p. 186°C–188°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 12.41 (m, 1H), 9.25 (m, 1H), 8.10 (dd, 1H, *J*₁ = 1.2 Hz, *J*₂ = 0.9 Hz), 7.63–7.56 (m, 3H), 7.48 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.34–7.22 (m, 3H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 175.1, 136.9, 133.9, 132.9 (2C), 131.7, 129.4 (2C), 126.7 (2C), 124.5 (2C), 122.0, 116.2. HRMS (ESI) calc. for $C_{14}H_9BrN_3S$ [M-H]⁻: 329.9701, found: 329.9708.

1-(4-Bromophenyl)-3-[2-cyanophenyl]thiourea (5i)

Yield 55% (0.61 g), white powder, m.p. 187°C–189°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 12.39 (m, 1H), 9.23 (m, 1H), 8.09 (dd, 1H, *J*₁ = 1.2 Hz, *J*₂ = 0.9 Hz), 7.70 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.63–7.57 (m, 1H), 7.33–7.30 (m, 1H), 7.27–7.21 (m, 3H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 174.6, 136.5, 133.4 (2C), 132.5, 131.9 (3C), 126.2 (2C), 123.9 (2C), 121.3, 115.7. HRMS (ESI) calc. for $C_{14}H_9BrN_3S$ [M-H]⁻: 329.9701, found: 329.9708.

1-(2-Cyanophenyl)-3-[4-iodophenyl]thiourea (5j)

Yield 50% (0.64 g), pale yellow powder, m.p. 256°C–258°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 12.39 (m, 1H), 9.25 (m, 1H), 8.09 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 7.86 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.62–7.57 (m, 1H), 7.32–7.21 (m, 2H), 7.08 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ (ppm): 174.5, 138.4, 136.4, 133.4 (2C), 131.9 (3C), 126.2 (2C), 123.9 (2C), 115.7, 94.2. HRMS (ESI) calc. for $C_{14}H_9IN_3S$ [M-H]⁻: 377.9562, found: 377.9550.

4.2 | Biological studies

4.2.1 | Cell cultures

The human primary (SW480) and metastatic (SW620) colon cancer, metastatic prostate cancer (PC3), chronic myelogenous leukemia (K-562), and human immortal keratinocyte (HaCaT) cell lines were recruited from the American Type Culture Collection (ATCC). The cells were cultured in the recommended medium according to protocols (RPMI 1640 for PC3 and K-562, MEM for SW480 and SW620 as well as DMEM for HaCaT cells) with addition of 10% FBS, penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 µg/mL) and cultured in 37°C/5% CO₂ in a humidified incubator. Then, the cells were passaged (excluding the non-adherent K-562 cell line) at a confluence of 80%–90% by a treatment with 0.25% trypsin (Gibco Life Technologies) and used for studies.

4.2.2 | MTT tests

Thiourea derivatives and standard drugs—doxorubicin and cisplatin, were tested at various concentrations (ranged from 1 to 100 μM). They were added to 96-well plates with seeded normal and cancer cells (1×10^4 cells per well) and incubated for 72 h. MTT analysis was performed according to a previous study.^[43] Cell absorbance results were inserted into the formula for the relative MTT level (%). It allows us to calculate the viability of cells under the influence of the tested compounds. Cell viability was expressed as the percentage of MTT reduction in cells treated with tested compounds compared to the control sample. The relative MTT level was calculated using the formula: $[100\%] = A/B \times 100\%$, where A is the test sample absorbance and B is the control sample absorbance. The IC_{50} values were estimated using GraphPad Prism 9 software (GraphPad Software).

4.2.3 | Annexin binding assay

The apoptotic and necrotic cells treated with thiourea derivatives were detected using the fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences Pharmingen). Briefly, cells (2×10^5 cells/well) were seeded in 6-well plates in supplemented medium. After 24 h, cells were incubated with studied compounds at their IC_{50} concentrations for 72 h. Then cells were harvested, washed, and labeled with Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) according to the manufacturer's protocol. The stained cells were analyzed by flow cytometry. The cells were identified as early apoptotic (Annexin V+/PI-) or late apoptotic/necrotic (Annexin V+/PI+).

4.2.4 | Caspase-3 and caspase-7 activity assay

To determine the activity of enforcement caspases, the caspase Glo 3/7 Assay (Promega) was used. Cells (1×10^4 cells/well) were cultured in white 96-well luminometer plates. After preincubation (24 h) cells were treated with thiourea compounds at their IC_{50} concentrations for 12, 24, and 48 h. Briefly, the caspase Glo 3/7 Buffer was mixed with caspase Glo 3/7 Substrate to form caspase Glo 3/7 Reagent. Next, 100 μL of the caspase Glo 3/7 Reagent was added to 96-well luminometer plates containing 100 μL of blank, negative control cells or treated cells in culture medium. The amount of generated luminescence was measured after 3 h in the luminometer Synergy HTX Multi-Mode Reader (BioTek Instruments). The blank (culture medium plus DMSO—solvent of tested compounds) was used to measure background luminescence. The untreated cells were used as a negative control.

4.2.5 | Cell cycle analysis

Cells (1×10^5 cells/well) were seeded on a six-well plate for 24 h. Next, they were exposed to selected compounds at their IC_{50}

concentration for 24 h. Both detached and attached population of cells were collected and centrifuged at 400g for 5 min at 4°C. Next, cells were washed twice with 0.9% NaCl and fixed in 500 μL of 70% cold ethanol overnight. Before analysis, cells were centrifuged 850g for 5 min at 4°C and washed with PBS. Then, the cells were incubated with 50 μL of RNase (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 200 μL of PI (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 37°C for 30 min in the dark. At the end, 100 μL PBS was added to each sample. The cell cycle was analyzed by flow cytometry (Becton Dickinson FACS Verse). Cells were identified in various cell cycle stages: sub-G1, G0/G1, S, and G2/M phases.

4.2.6 | IL-6 assay

The concentration of IL-6 was measured in the cell culture supernatant using the IL-6 High Sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Diaclon SAS, Besancon Cedex). Cells (1×10^5 cells/well) were seeded in 12-well plates with medium for 24 h. Then, cells were treated with studied compounds at their IC_{50} concentrations for 72 h. After this incubation, the supernatants were collected and 100 μL of the supernatant samples, control solutions, and blank were added to a precoated ELISA plate with the preceding plotting of the standard curve. Then 50 μL of diluted biotinylated anti-human IL-6 antibody was added and incubated at room temperature for 3 h. Afterward, the plate was washed three times and 100 μL streptavidin-HRP solution was added to each well. After a 30-min incubation, the plate was washed again three times and 100 μL of tetramethylbenzidine (TMB) solution was added to each well. The plate was incubated for 15 min in the dark. The reaction was stopped by adding 100 μL of H_2SO_4 solution. The absorbance was estimated using a spectrophotometer at 450 nm (Microplate Spectrophotometer Thermo Scientific™ Multiskan™ GO).

4.2.7 | ROS detection—Dihydrorhodamine 123 (DHR-123) assay

ROS formation was measured using the spectrofluorometric method with DHR-123 based on the ROS-dependent oxidation of the compounds to the fluorescent oxidized form (rhodamine-123). All the tested cell lines were seeded on to 96-well plates (5×10^4 cells per well) and pre-incubated for 24 h. Next, they were cultured with DHR-123 (1 μM) for 30 min at 37°C in the dark and then cells were washed with PBS and treated for 2, 12, and 24 h at 37°C with phenol red-free culture medium containing the tested compounds at their IC_{50} concentrations. As a positive control, a sample with H_2O_2 (1.5 mM) was used, whereas a sample without any reagent was the negative control. The maximum stimulation and emission spectra for rhodamine-123 were 507 and 529 nm, respectively. The generation of H_2O_2 was measured by the Microplate Spectrofluorometer BioTek Synergy (BioTek Instruments) with a wavelength of 500–536 nm and expressed as fluorescence intensity (FI).

4.2.8 | Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 9 software (GraphPad Software). The results were calculated as mean $\pm$ SD from at least three independent experiments. Statistical significance of differences between values was established by analysis of variance with Dunnett's multiple comparison post hoc test and considered statistically significant at $p < 0.05$.

ACKNOWLEDGMENTS

The work was carried out as part of the project "Study of the mechanisms of cytotoxic activity of 1,3-disubstituted thiourea derivatives," No 1WK/3/M/MB/N22, implemented in the years 2022–2023, financed by a grant for science, obtained by the Medical University of Warsaw. Measurement and analysis of apoptosis by flow cytometry were performed in the Laboratory of Flow Cytometry (Department of Immunology, Faculty of Biology, University of Warsaw).

CONFLICTS OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

ORCID

Paulina Strzyga-Łach  <http://orcid.org/0000-0003-1830-2210>

Anna Bielenica  <http://orcid.org/0000-0003-3269-9672>

REFERENCES

- [1] J. Ferlay, M. Ervik, F. Lam, M. Colombet, L. Mery, M. Piñeros, A. Znaor, I. Soerjomataram, F. Bray, *Global Cancer Observatory: Cancer Today*, International Agency for Research on Cancer, Lyon 2020, <https://gco.iarc.fr/today> (accessed: February 2021).
- [2] G. Wu, Z. Zhu, J. Li, X. Luo, W. Zhu, G. Liao, J. Xia, W. Zhang, W. Pan, T. Li, S. Wu, *Bioorg. Med. Chem.* **2022**, 59, 116676. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2022.116676>
- [3] S. D. Calixto, T. L. B. V. Simão, M. V. Palmeira-Mello, G. M. Viana, P. W. M. C. Assumpção, M. G. Rezende, C. C. do Espírito Santo, de V. Oliveira Mussi, C. R. Rodrigues, E. Lasunskia, de A. M. T. Souza, L. M. Cabral, M. F. Muzitano, *Bioorg. Med. Chem.* **2022**, 53, 116506. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116506>
- [4] S. Mazzotta, T. Cebrero-Cangueiro, L. Frattaruolo, M. Vega-Holm, M. Carretero-Ledesma, J. Sánchez-Céspedes, A. R. Cappello, F. Aiello, J. Pachón, J. M. Vega-Pérez, F. Iglesias-Guerra, M. E. Pachón-Ibáñez, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, 30(18), 127411. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127411>
- [5] A. Bielenica, J. Stefańska, K. Stępień, A. Napiórkowska, E. Augustynowicz-Kopeć, G. Sanna, S. Madeddu, S. Boi, G. Giliberti, M. Wrzosek, M. Struga, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 101, 111. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.027>
- [6] A. Bielenica, K. Stępień, A. Napiórkowska, E. Augustynowicz-Kopeć, S. Krukowski, M. Włodarczyk, M. Struga, *Chem. Biol. Drug Des.* **2016**, 87(6), 905. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12723>
- [7] A. Bielenica, G. Sanna, S. Madeddu, M. Struga, M. Jóźwiak, A. E. Koziół, A. Sawcenko, I. B. Materek, A. Serra, G. Giliberti, *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, 90(5), 883. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13009>
- [8] H. Kondo, T. Koshizuka, R. Majima, K. Takahashi, K. Ishioka, T. Suzutani, N. Inoue, *Antiviral Res.* **2021**, 196, 105207. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105207>
- [9] N. Siddiqui, M. S. Alam, M. Sahu, M. J. Naim, M. S. Yar, O. Alam, *Bioorg. Chem.* **2017**, 71, 230. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.02.009>
- [10] M. Matias, G. Campos, S. Silvestre, A. Falcão, G. Alves, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, 102, 264. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.03.014>
- [11] R. A. Wagdy, P. J. Chen, M. M. Hamed, S. S. Darwish, S. H. Chen, A. H. Abadi, M. Abdel-Halim, T. L. Hwang, M. Engel, *Bioorg. Chem.* **2022**, 127, 105977. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105977>
- [12] U. Kollu, V. K. R. Avula, S. Vallela, V. R. Pasupuleti, G. V. Zyryanov, Y. S. Neelam, N. R. Chamarthi, *Bioorg. Chem.* **2021**, 111, 104837. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104837>
- [13] A. Chrzanowska, A. Drzewiecka-Antonik, K. Dobrzyńska, J. Stefańska, P. Pietrzyk, M. Struga, A. Bielenica, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22(21), 11415. <https://doi.org/10.3390/ijms222111415>
- [14] M. S. Ricci, W. X. Zong, *Oncologist* **2006**, 11(4), 342. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-4-342>
- [15] R. M. Sbenati, S. O. Zareei, M. I. El-Gamal, H. S. Anbar, H. Tarazi, M. M. Zoghbor, N. A. Mohamood, M. M. Khakpour, D. M. Zaher, H. A. Omar, N. N. Alach, M. K. Shehata, R. El-Gamal, *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, 210, 113081. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113081>
- [16] B. Yu, Y. Liu, X. Peng, S. Hua, G. Zhou, K. Yan, Y. Liu, *Metallomics* **2020**, 12(1), 104. <https://doi.org/10.1039/c9mt00232d>
- [17] G. J. V. Pereira, M. T. Tavares, R. A. Azevedo, B. B. Martins, M. R. Cunha, R. Bhardwaj, Y. Cury, V. O. Zambelli, E. G. Barbosa, M. A. Hediger, R. Parise-Filho, *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, 27(13), 2893. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.05.020>
- [18] J. Johnson, P. Rychahou, V. M. Sviripa, H. L. Weiss, C. Liu, D. S. Watt, B. M. Evers, *PLoS One* **2019**, 14(3), e0209392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209392>
- [19] A. Türe, M. Ergül, M. Ergül, A. Altun, İ. Küçükgül, *Mol. Divers.* **2021**, 25(2), 1025. <https://doi.org/10.1007/s11030-020-10087-1>
- [20] S. Y. Abbas, R. A. K. Al-Harbi, M. A. M. Sh El-Sharief, *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, 198, 112363. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112363>
- [21] R. A. K. Al-Harbi, M. A. M. S. El-Sharief, S. Y. Abbas, *Bioorg. Chem.* **2019**, 90, 103088. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103088>
- [22] R. Tokala, S. Bale, I. P. Janrao, A. Vennela, N. P. Kumar, K. R. Senwar, C. Godugu, N. Shankaraiah, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, 28(10), 1919. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.03.074>
- [23] F. A. F. Ragab, S. A. Abdel-Aziz, M. Kamel, A. M. A. Ouf, H. A. Allam, *Bioorg. Chem.* **2019**, 93, 103323. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103323>
- [24] S. A. Pérez, de C. Haro, C. Vicente, A. Donaire, A. Zamora, J. Zajac, H. Kostrhunova, V. Brabec, D. Bautista, J. Ruiz, *ACS Chem. Biol.* **2017**, 12(6), 1524. <https://doi.org/10.1021/acscmbio.7b00090>
- [25] J. C. Shing, J. W. Choi, R. Chapman, M. A. Schroeder, J. N. Sarkaria, A. Fauq, R. J. Bram, *Cancer Biol. Ther.* **2014**, 15(7), 895. <https://doi.org/10.4161/cbt.28881>
- [26] B. Dai, T. Yang, X. Shi, N. Ma, Y. Kang, J. Zhang, Y. Zhang, *Phytomedicine* **2018**, 51, 48. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.06.028>
- [27] R. S. Viswas, S. Pundir, H. Lee, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2019**, 34(1), 620. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1571055>
- [28] S. A. Elseginy, R. Hamdy, V. Menon, A. M. Almhedi, R. El-Awady, S. S. M. Soliman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, 30(24), 127658. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127658>
- [29] S. Mowafy, A. Galanis, Z. M. Doctor, R. M. Paranal, D. S. Lasheen, N. A. Farag, P. A. Jänne, K. A. M. Abouzid, *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24(16), 3501. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.063>
- [30] M. M. Hamed, S. S. Darwish, J. Herrmann, A. H. Abadi, M. Engel, *J. Med. Chem.* **2017**, 60(7), 2853. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01774>
- [31] Y. Zhang, X. Meng, H. Tang, M. Cheng, F. Yang, W. Xu, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, 35(1), 344. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1702653>

- [32] L. Conesa-Milián, E. Falomir, J. Murga, M. Carda, J. A. Marco, *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 162, 781. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.11.023>
- [33] Y. Sun, Y. Shan, C. Li, R. Si, X. Pan, B. Wang, J. Zhang, *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 141, 373. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.008>
- [34] J. Janockova, J. Korabecny, J. Plsikova, K. Babkova, E. Konkolova, D. Kucerova, J. Vargova, J. Koval, R. Jendzelovsky, P. Fedorocko, J. Kasparkova, V. Brabec, J. Rosocha, O. Soukup, S. Hamulakova, K. Kuca, M. Kozurkova, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2019**, 34(1), 877. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1593159>
- [35] İ. Koca, A. Özgür, M. Er, M. Gümüş, K. Açıkalın Coşkun, Y. Tutar, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 122, 280. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.06.032>
- [36] L. Y. Ma, Y. C. Zheng, S. Q. Wang, B. Wang, Z. R. Wang, L. P. Pang, M. Zhang, J. W. Wang, L. Ding, J. Li, C. Wang, B. Hu, Y. Liu, X. D. Zhang, J. J. Wang, Z. J. Wang, W. Zhao, H. M. Liu, *J. Med. Chem.* **2015**, 58(4), 1705. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00037>
- [37] M. M. Ghorab, M. S. Alsaïd, M. S. A. El-Gaby, N. A. Safwat, M. M. Elaasser, A. M. Soliman, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 124, 299. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.060>
- [38] S. I. Farooqi, N. Arshad, F. Perveen, P. A. Channar, A. Saeed, A. Javed, *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, 666, 83. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.03.021>; Erratum in: *Arch. Biochem. Biophys.* **2020**, 686, 10826.
- [39] M. Kožurková, D. Sabolová, P. Kristian, *J. Appl. Toxicol.* **2017**, 37(10), 1132. <https://doi.org/10.1002/jat.3464>
- [40] G. Wang, S. Sun, H. Guo, *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, 229, 113999. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113999>
- [41] S. Issa, A. Prandina, N. Bedel, P. Rongved, S. Yous, M. Le Borgne, Z. Bouaziz, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2019**, 34(1), 1321. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1640692>
- [42] M. Itoigawa, Y. Kashiwada, C. Ito, H. Furukawa, Y. Tachibana, K. F. Bastow, K. H. Lee, *J. Nat. Prod.* **2000**, 63(7), 893. <https://doi.org/10.1021/np000020e>
- [43] P. Strzyga-Łach, A. Chrzanowska, K. Podsadni, A. Bielenica, *Pharmaceuticals* **2021**, 14(11), 1097. <https://doi.org/10.3390/ph14111097>
- [44] A. Bielenica, G. Sanna, S. Madeddu, G. Giliberti, J. Stefańska, A. Koziół, O. Savchenko, P. Strzyga-Łach, A. Chrzanowska, G. Kubiak-Tomaszewska, M. Struga, *Molecules* **2018**, 23(10), 2428. <https://doi.org/10.3390/molecules23102428>
- [45] C. R. W. Guimarães, A. M. Mathiowetz, M. Shalaeva, G. Goetz, S. Liras, *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52(4), 882. <https://doi.org/10.1021/ci300010y>
- [46] J. Liu, Y. Peng, W. Wei, *Trends Cell Biol.* **2022**, 32(1), 30. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.07.001>
- [47] D. C. Chonov, M. M. K. Ignatova, J. R. Ananiev, M. V. Gulubova, *Open Access Maced. J. Med. Sci.* **2019**, 7(14), 2391. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.589>
- [48] K.-Y. Yeh, Y.-Y. Li, L.-L. Hsieh, C.-H. Lu, W.-C. Chou, C.-C. Liaw, R.-P. Tang, S.-K. Liao, *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2010**, 40(6), 580. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyq010>
- [49] A. L. Serrano, B. Baeza-Raja, E. Perdiguero, M. Jardí, P. Muñoz-Cánoves, *Cell Metab.* **2008**, 7(1), 33. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007>
- [50] K. Hänel, C. Cornelissen, B. Lüscher, J. Baron, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, 14(4), 6720. <https://doi.org/10.3390/ijms14046720>
- [51] B. Perillo, M. Di Donato, A. Pezone, E. Di Zazzo, P. Giovannelli, G. Galasso, G. Castoria, A. Migliaccio, *Exp. Mol. Med.* **2020**, 52(2), 192–203. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0384-2>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: P. Strzyga-Łach, A. Chrzanowska, E. Kiernozek-Kalińska, B. Żyżyńska-Granica, K. Podsadni, P. Podsadni, A. Bielenica, *Arch. Pharm.* **2023**, e2300105. <https://doi.org/10.1002/ardp.202300105>

Podsumowanie i wnioski

W ramach prowadzonych eksperymentów oceniono cytotoksyczność 28 nowych, zróżnicowanych strukturalnie pochodnych tiomocznika wobec nowotworów litych (SW480, SW620, PC3), względem nowotworu hematologicznego (K-562) oraz prawidłowych keratynocytów (HaCaT). Najbardziej aktywne pochodne (**1–3, 8, 9** oraz **1a, 2b, 3a, 3b, 4a, 5d i 5j**) zostały wybrane do dalszych badań nad mechanizmami ich cytotoksycznego działania.

- Związki **1–5, 8 i 9** wykazały wysoką cytotoksyczność wobec ludzkich komórek nowotworowych jelita grubego oraz prostaty i linii komórkowej białaczki ($IC_{50} \leq 10 \mu M$), z korzystną selektywnością w stosunku do prawidłowych komórek.
- Ustalono mechanizmy cytotoksycznego działania dla wyselekcjonowanych, najbardziej bioaktywnych pochodnych tiomocznika. Związki te redukowały liczbę komórek nowotworowych i ich przeżywalność. Tiomocznikowe pochodne **1, 2 i 8** wykazały silną aktywność pro-apoptotyczną. Wszystkie związki obniżyły ilość wydzielanej IL-6 z wiodącą aktywnością prezentowana przez pochodne **2 i 8**.
- Zidentyfikowano najbardziej optymalną modyfikację strukturalną tiomocznika pod postacią dichloropochodnej **2** i 4-(triflorometylo)fenylowej pochodnej **8**, a następnie przeprowadzono zaawansowane badania mechanizmów ukierunkowanych na kluczowe szlaki molekularne zaangażowane w progresję nowotworu.
- Obie pochodne **2 i 8** indukowały aktywność kaspaz 3/7, aktywowały produkcję RFT, a także hamowały uwalnianie NF- κ B i VEGF w komórkach nowotworowych. Analiza metabolomiczna wykazała interesujące zmiany w profilach metabolicznych komórek nowotworowych, szczególnie w metabolizmie lipidów i pirymidyn. Wydaje się, działanie związku **2** prowadzi do bardziej korzystnych zmian, zmniejszając ilość metabolitów kluczowych w progresji nowotworu. Potwierdziła to również ocena żywotności komórek w sferoidach 3D, gdzie komórki SW620 okazały się bardziej wrażliwe na związek **2** niż na obecność pochodnej **8**.
- Związki **1a, 3a, 3b, 5j** charakteryzowały się wysokim potencjałem cytotoksycznym w stosunku do komórek SW480, pochodne **2b, 3a, 4a** wobec K-

562, a **5d** wobec PC3, w wymiarze porównywalnym lub silniejszym niż powszechnie stosowany lek przeciwnowotworowy – cisplatyna, z potwierdzonym bezpieczeństwem ich stosowania.

- Wyselekcjonowano tiomoczniki **1a**, **2b**, **3a** i **4a** jako najskuteczniejsze aktywatory wczesnej apoptozy w komórkach K-562, natomiast związki **1a**, **3b** i **5j** jako induktory późnej apoptozy lub nekrozy w komórkach SW480. Efekt proapoptotyczny został potwierdzony istotnym wzrostem aktywacji kaspaz 3/7. Analiza cyklu komórkowego wykazała, że pochodne **1a**, **3a** i **5j** zwiększyły liczbę komórek SW480 i K-562 w fazach sub-G1 i/lub G0/G1 i wywołały zatrzymanie cyklu w fazie G2. Zahamowanie na tym etapie cyklu może świadczyć o uszkodzeniach DNA lub zaburzeniach w formowaniu wrzeciona podziałowego, co wskazuje na ich działanie cytotoksyczne i indukcję apoptozy.
- Najskuteczniejsze cytotoksycznie pochodne tiomocznika hamowały wydzielanie cytokiny IL-6 z komórek PC3 oraz obu linii komórkowych raka jelita grubego (SW480 i SW620). Związki indukujące apoptozę zwiększały również produkcję RTF we wszystkich liniach komórek nowotworowych.

Przeprowadzone badania wykazały, że wybrane pochodne tiomocznika charakteryzują się silnym i selektywnym działaniem cytotoksycznym wobec różnych linii komórek nowotworowych, przewyższającym w niektórych przypadkach skuteczność referencyjnej cisplatyny. Zidentyfikowano mechanizmy molekularne leżące u podstaw ich aktywności, obejmujące indukcję apoptozy, zahamowanie kluczowych szlaków proliferacyjnych i angiogenezy, a także modulację odpowiedzi zapalnej i metabolizmu komórkowego. Szczególnie obiecujące okazały się pochodne dihalogenofenyłowe, które wykazały wielokierunkowe działanie przeciwnowotworowe oraz korzystny profil bezpieczeństwa. Uzyskane wyniki stanowią solidną podstawę do dalszych badań nad rozwojem tych związków jako potencjalnych kandydatów do terapii nowotworowej.

Piśmiennictwo

1. Mukherjee, S., *Cesarz wszech chorób. Biografia raka*. 2013: Wydawnictwo Czarne
2. Anand, U., et al., *Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics*. Genes & Diseases, 2023. **10**(4): p. 1367-1401.
3. Liu, B., et al., *Exploring treatment options in cancer: tumor treatment strategies*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024. **9**(1): p. 175.
4. Ferlay, J., et al., *Cancer statistics for the year 2020: An overview*. Int J Cancer, 2021.
5. Perez, S.A., et al., *New Acridine Thiourea Gold(I) Anticancer Agents: Targeting the Nucleus and Inhibiting Vasculogenic Mimicry*. ACS Chem Biol, 2017. **12**(6): p. 1524-1537.
6. Agili, F.A. *Biological Applications of Thiourea Derivatives: Detailed Review*. Chemistry, 2024. **6**, 435-468 DOI: 10.3390/chemistry6030025.
7. Yeşilkaynak, T., et al., *Synthesis of new thiourea derivatives and metal complexes: Thermal behavior, biological evaluation, in silico ADMET profiling and molecular docking studies*. Journal of Molecular Structure, 2022. **1269**: p. 133758.
8. Canudo-Barreras, G., et al. *Synthesis of New Thiourea-Metal Complexes with Promising Anticancer Properties*. Molecules, 2021. **26**, DOI: 10.3390/molecules26226891.
9. Yang, M., et al., *Synthesis, reactivity, and biological activity of gold(I) complexes modified with thiourea-functionalized tyrosine kinase inhibitors*. Inorg Chem, 2015. **54**(7): p. 3316-24.
10. Mani, S., G. Swargiary, and S.J. Ralph, *Targeting the redox imbalance in mitochondria: A novel mode for cancer therapy*. Mitochondrion, 2022. **62**: p. 50-73.
11. Yu, B., et al., *Synthesis, characterization, and antitumor properties of Au(i)-thiourea complexes*. Metallomics, 2020. **12**(1): p. 104-113.
12. Elebiyo, T.C., et al., *Reassessing vascular endothelial growth factor (VEGF) in anti-angiogenic cancer therapy*. Cancer Treat Res Commun, 2022. **32**: p. 100620.

13. Fadaly, W.A.A., M.T.M. Nemr, and N.M. Kahk, *Discovery of novel pyrazole based Urea/Thiourea derivatives as multiple targeting VEGFR-2, EGFR(WT), EGFR(T790M) tyrosine kinases and COX-2 Inhibitors, with anti-cancer and anti-inflammatory activities*. Bioorg Chem, 2024. **147**: p. 107403.
14. Ricci, M.S. and W.X. Zong, *Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways*. Oncologist, 2006. **11**(4): p. 342-57.
15. Sbenati, R.M., et al., *Design, synthesis, biological evaluation, and modeling studies of novel conformationally-restricted analogues of sorafenib as selective kinase-inhibitory antiproliferative agents against hepatocellular carcinoma cells*. Eur J Med Chem, 2021. **210**: p. 113081.
16. Abbas, S.Y., R.A.K. Al-Harbi, and M.A.M. Sh El-Sharief, *Synthesis and anticancer activity of thiourea derivatives bearing a benzodioxole moiety with EGFR inhibitory activity, apoptosis assay and molecular docking study*. Eur J Med Chem, 2020. **198**: p. 112363.
17. Strzyga-Łach, P., et al., *Investigation of the Mechanisms of Cytotoxic Activity of 1,3-Disubstituted Thiourea Derivatives*. Pharmaceuticals (Basel), 2021. **14**(11).
18. Kirishnamaline, G., et al., *Theoretical investigation of structure, anticancer activity and molecular docking of thiourea derivatives*. Journal of Molecular Structure, 2021. **1225**: p. 129118.
19. Bielenica, A., et al., *Synthesis, cytotoxicity and antimicrobial activity of thiourea derivatives incorporating 3-(trifluoromethyl)phenyl moiety*. Eur J Med Chem, 2015. **101**: p. 111-25.
20. Maalik, A., et al., *Synthesis, antimicrobial, antioxidant, cytotoxic, antiurease and molecular docking studies of N-(3-trifluoromethyl)benzoyl-N'-aryl thiourea derivatives*. Bioorganic Chemistry, 2019. **88**: p. 102946.
21. El-Atawy, M.A., et al., *Synthesis, Characterization, and Anticancer Activity of New N,N'-Diarylthiourea Derivative against Breast Cancer Cells*. Molecules, 2023. **28**(17).
22. Quero, J., et al., *Sulfonamide-Derived Dithiocarbamate Gold(I) Complexes Induce the Apoptosis of Colon Cancer Cells by the Activation of Caspase 3 and Redox Imbalance*. Biomedicines, 2022. **10**(6).
23. Ture, A., et al., *Design, synthesis, and anticancer activity of novel 4-thiazolidinone-phenylaminopyrimidine hybrids*. Mol Divers, 2021. **25**(2): p. 1025-1050.

24. Ghorab, M.M., et al., *Design, synthesis and anticancer activity of some novel thioureido-benzenesulfonamides incorporated biologically active moieties*. Chem Cent J, 2016. **10**: p. 19.
25. Liu, S., et al., *Synthesis and evaluation of the diarylthiourea analogs as novel anti-cancer agents*. Bioorg Med Chem Lett, 2015. **25**(6): p. 1301-5.
26. Johnson, J., et al., *Induction of AMPK activation by N,N'-diarylurea FND-4b decreases growth and increases apoptosis in triple negative and estrogen-receptor positive breast cancers*. PLoS One, 2019. **14**(3): p. e0209392.
27. Shing, J.C., et al., *A novel synthetic 1,3-phenyl bis-thiourea compound targets microtubule polymerization to cause cancer cell death*. Cancer Biol Ther, 2014. **15**(7): p. 895-905.
28. Dai, B., et al., *HMQ-T-F5 (1-(4-(2-aminoquinazolin-7-yl)phenyl)-3-(2-bromo-5-(trifluoromethoxy)phenyl) thiourea) suppress proliferation and migration of human cervical HeLa cells via inhibiting Wnt/beta-catenin signaling pathway*. Phytomedicine, 2018. **51**: p. 48-57.
29. Viswas, R.S., S. Pundir, and H. Lee, *Design and synthesis of 4-piperazinyl quinoline derived urea/thioureas for anti-breast cancer activity by a hybrid pharmacophore approach*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2019. **34**(1): p. 620-630.
30. Keating, G.M., *Sorafenib: A Review in Hepatocellular Carcinoma*. Target Oncol, 2017. **12**(2): p. 243-253.
31. Lain, S., et al., *Discovery, in vivo activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator*. Cancer Cell, 2008. **13**(5): p. 454-63.
32. Chrzanowska, A., et al. *The Cytotoxic Effect of Copper (II) Complexes with Halogenated 1,3-Disubstituted Arylthioureas on Cancer and Bacterial Cells*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**, DOI: 10.3390/ijms222111415.
33. Zhang, Y., et al., *Design, synthesis, and biological evaluation of novel substituted thiourea derivatives as potential anticancer agents for NSCLC by blocking K-Ras protein-effectors interactions*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2020. **35**(1): p. 344-353.
34. Pingaew, R., et al., *Anticancer activity and QSAR study of sulfur-containing thiourea and sulfonamide derivatives*. Heliyon, 2022. **8**(8): p. e10067.

35. Fotakis, G. and J.A. Timbrell, *In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride*. Toxicology Letters, 2006. **160**(2): p. 171-177.
36. Strober, W., *Trypan blue exclusion test of cell viability*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Appendix 3**: p. Appendix 3B.
37. Rudnicka, K., et al., *APOPTOSIS AND AUTOPHAGY - MECHANISMS AND DETECTION METHODS*. Postepy Biologii Komorki, 2011. **38**: p. 247-265.
38. Sachet, M., Y.Y. Liang, and R. Oehler, *The immune response to secondary necrotic cells*. Apoptosis, 2017. **22**(10): p. 1189-1204.
39. Chechlińska, M., *Rola cytokin w procesach nowotworzenia*. Nowotwory, 2003. **53**: p. 648-659.
40. Parfiniewicz, B., L. Węglarz, and A. Hollek, *Evaluation of IL-6 secretion by colon cancer cells treated with phytic acid*. Annales Academiae Medicae Silesiensis, 2009. **63**(6): p. 23-31.
41. Fryczkowski, M., et al., *Wpływ wybranych cytokin prozapalnych oraz stresu oksydacyjnego na kancerogenezę i progresję gruczolakoraków jelita i prostaty*. Annales Academiae Medicae Silesiensis, 2019. **73**: p. 182-193.
42. Slee, E.A., C. Adrain, and S.J. Martin, *Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7320-6.
43. Huang, J.S., et al., *Caspase-3 expression in tumorigenesis and prognosis of buccal mucosa squamous cell carcinoma*. Oncotarget, 2017. **8**(48): p. 84237-84247.
44. Zhou, M., et al., *Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells*. Int J Cancer, 2018. **143**(4): p. 921-930.
45. Małecki, M. and S. Rzońca, *Indukcja apoptozy jako cel terapii genowej nowotworów*. Postępy Biologii Komórki 2005. **32**(2): p. 327-341.
46. Gorrini, C., I.S. Harris, and T.W. Mak, *Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy*. Nature Reviews Drug Discovery, 2013. **12**(12): p. 931-947.
47. Singh, R. and P.P. Manna, *Reactive oxygen species in cancer progression and its role in therapeutics*. Exploration of Medicine, 2022. **3**(1): p. 43-57.
48. Perillo, B., et al., *ROS in cancer therapy: the bright side of the moon*. Experimental & Molecular Medicine, 2020. **52**(2): p. 192-203.

49. Skórka, K. and K. Giannopoulos, *Budowa i funkcje jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF-κB) oraz jego znaczenie w przewlekłej białaczce limfocytowej*. Acta Haematologica Polonica, 2012. **43**(1): p. 54-62.
50. Xia, Y., S. Shen, and I.M. Verma, *NF-kappaB, an active player in human cancers*. Cancer Immunol Res, 2014. **2**(9): p. 823-30.
51. Bielenberg, D.R. and B.R. Zetter, *The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis*. Cancer J, 2015. **21**(4): p. 267-73.
52. Medinger, M. and J. Passweg, *Role of tumour angiogenesis in haematological malignancies*. Swiss Med Wkly, 2014. **144**: p. w14050.
53. Song, G., Y. Li, and G. Jiang, *Role of VEGF/VEGFR in the pathogenesis of leukemias and as treatment targets (Review)*. Oncol Rep, 2012. **28**(6): p. 1935-1944.
54. Aboutaleb, M.H., et al., *Design, synthesis, and evaluation of new benzimidazole thiourea derivatives as antitumor agents*. Arch Pharm (Weinheim), 2023. **356**(11): p. e2300269.
55. Ragab, F.A.F., et al., *Design, synthesis and biological evaluation of some new 1,3,4-thiadiazine-thiourea derivatives as potential antitumor agents against non-small cell lung cancer cells*. Bioorganic Chemistry, 2019. **93**: p. 103323.
56. Tufail, M., C.-H. Jiang, and N. Li, *Altered metabolism in cancer: insights into energy pathways and therapeutic targets*. Molecular Cancer, 2024. **23**(1): p. 203.
57. Das, P.K., et al., *Implications of estrogen and its receptors in colorectal carcinoma*. Cancer Medicine, 2023. **12**(4): p. 4367-4379.
58. Zhang, Y.L., et al., *Progesterone suppresses the progression of colonic carcinoma by increasing the activity of the GADD45alpha/JNK/c-Jun signalling pathway*. Oncol Rep, 2021. **45**(6).
59. Wenxuan, L., et al., *Role of gonadally synthesized steroid hormones in the colorectal cancer microenvironment*. Front Oncol, 2023. **13**: p. 1323826.
60. Sidler, D., et al., *Colon cancer cells produce immunoregulatory glucocorticoids*. Oncogene, 2011. **30**(21): p. 2411-9.
61. Tallima, H. and R. El Ridi *Mechanisms of Arachidonic Acid In Vitro Tumorcidal Impact*. Molecules, 2023. **28**, DOI: 10.3390/molecules28041727.
62. Zhang, C., et al., *The arachidonic acid metabolome reveals elevation of prostaglandin E2 biosynthesis in colorectal cancer*. Analyst, 2024. **149**(6): p. 1907-1920.

63. Jara-Gutierrez, A. and V. Baladron, *The Role of Prostaglandins in Different Types of Cancer*. Cells, 2021. **10**(6).
64. Murata, T., et al., *Prostaglandin D2 is a mast cell-derived antiangiogenic factor in lung carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(49): p. 19802-7.
65. Chen, C., J. Xia, and Z. and Zhao, *Inhibition or promotion, the potential role of arginine metabolism in immunotherapy for colorectal cancer*. All Life, 2023. **16**(1): p. 2163306.
66. Garcia-Barros, M., et al., *Sphingolipids in colon cancer*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(5): p. 773-82.
67. Pyne, N.J. and S. Pyne, *Sphingosine 1-phosphate and cancer*. Nature Reviews Cancer, 2010. **10**(7): p. 489-503.
68. Penning, T.M. and A.J. Detlefsen, *Intracrinology-revisited and prostate cancer*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2020. **196**: p. 105499.
69. Watek, M., et al., *Unexpected profile of sphingolipid contents in blood and bone marrow plasma collected from patients diagnosed with acute myeloid leukemia*. Lipids Health Dis, 2017. **16**(1): p. 235.
70. Freitas de Moraes, E., et al., *Use of Three-Dimensional Cell Culture Models in Drug Assays for Anti-Cancer Agents in Oral Cancer: Protocol for a Scoping Review*. J Pers Med, 2023. **13**(11).
71. Wang, G., S. Sun, and H. Guo, *Current status of carbazole hybrids as anticancer agents*. Eur J Med Chem, 2022. **229**: p. 113999.
72. Guimarães, C.R.W., et al., *Use of 3D Properties to Characterize Beyond Rule-of-5 Property Space for Passive Permeation*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2012. **52**(4): p. 882-890.
73. Sun, Y., et al. *The Influence of Cell Cycle Regulation on Chemotherapy*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**, DOI: 10.3390/ijms22136923.
74. Al-Harbi, R.A.K., M. El-Sharief, and S.Y. Abbas, *Synthesis and anticancer activity of bis-benzo[d][1,3]dioxol-5-yl thiourea derivatives with molecular docking study*. Bioorg Chem, 2019. **90**: p. 103088.
75. Hänel, K.H., et al. *Cytokines and the Skin Barrier*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**, 6720-6745 DOI: 10.3390/ijms14046720.

Oświadczenia współautorów

Warszawa, 23.05.2025

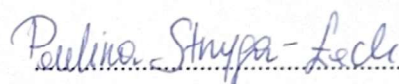
mgr Paulina Strzyga-Lach

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Investigation of the mechanisms of cytotoxic activity of 1,3-disubstituted thiourea derivatives** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowią:

planowanie i realizacja eksperymentów, analiza oraz interpretacja wyników badań, przygotowanie publikacji naukowej oraz wizualizacja danych.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określám jako 65 %.



(podpis oświadczającego)

Warszawa, 23.05.2025

dr hab. Alicja Chrzanowska

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Investigation of the mechanisms of cytotoxic activity of 1,3-disubstituted thiourea derivatives** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowią:

formułowanie koncepcji badawczej, nadzór naukowy - weryfikacja wyników badań oraz ich analiza, przygotowanie oraz redagowanie publikacji naukowej.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 15 %.

Wkład Pauliny Strzygi-Lach w powstawanie publikacji określam jako 65 %,

obejmował on planowanie i realizację eksperymentów, analizę oraz interpretację wyników badań, przygotowanie publikacji naukowej oraz wizualizację danych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Strzygi-Lach.

KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII
.....Alicja Chrzanowska.....
dr hab. i med. Alicja Chrzanowska
(podpis Alicja Chrzanowska)

Warszawa, 23.05.2025

mgr Katarzyna Podsadni

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Investigation of the mechanisms of cytotoxic activity of 1,3-disubstituted thiourea derivatives** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowią:

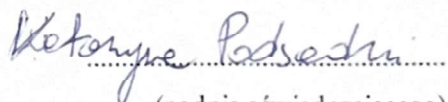
oczyszczenie zsyntetyzowanych związków i przygotowanie ich do badań biologicznych.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określám jako 5 %.

Wkład Pauliny Strzygi-Łach w powstawanie publikacji określám jako 65 %,

obejmował on planowanie i realizację eksperymentów, analizę oraz interpretację wyników badań, przygotowanie publikacji naukowej oraz wizualizację danych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Strzygi-Łach.


(podpis oświadczającego)

Dr hab. Anna Bielenica

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Investigation of the mechanisms of cytotoxic activity of 1,3-disubstituted thiourea derivatives** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowią:

formułowanie koncepcji badawczej, synteza związków chemicznych, interpretacja wyników badań oraz udział w pisaniu publikacji.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określám jako 15 %.

Wkład Pauliny Strzygi-Łach w powstawanie publikacji określám jako 65 %,

obejmował on planowanie i realizację eksperymentów, analizę oraz interpretację wyników badań, przygotowanie publikacji naukowej oraz wizualizację danych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Strzygi-Łach.

.....*Anna Bielenica*.....

(podpis oświadczającego)

mgr Paulina Strzyga-Łach

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **1,3-disubstituted thiourea derivatives: promising candidates for medicinal applications with enhanced cytotoxic effects on cancer cells** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowią:

koordynacja projektu, opracowanie metodologii doświadczeń, przeprowadzenie badań eksperymentalnych, analiza i wizualizacja danych oraz przygotowanie publikacji naukowej.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określám jako 60 %.

Paulina Strzyga-Łach

(podpis oświadczającego)

dr Dagmara Kurpios-Piec

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **1,3-disubstituted thiourea derivatives: promising candidates for medicinal applications with enhanced cytotoxic effects on cancer cells** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowią:

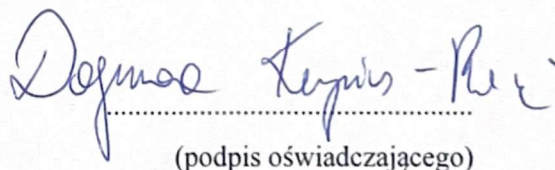
opracowanie metodologii, weryfikacja wyników i opracowanie danych, przygotowanie oraz redagowanie publikacji naukowej.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 15 %.

Wkład Pauliny Strzygi-Lach w powstawanie publikacji określam jako 60 %,

obejmował on koordynację projektu, opracowanie metodologii doświadczeń, przeprowadzenie badań eksperymentalnych, analizę i wizualizację danych oraz przygotowanie publikacji naukowej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Strzygi-Lach.


.....
(podpis oświadczającego)

dr hab. Alicja Chrzanowska

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **1,3-Disubstituted thiourea derivatives: promising candidates for medicinal applications with enhanced cytotoxic effects on cancer cells** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowią:

formułowanie koncepcji badawczej, opracowanie metodologii i analiza danych, nadzór naukowy oraz przygotowanie i redagowanie publikacji naukowej.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określám jako 15 %.

Wkład Pauliny Strzygi-Lach w powstawanie publikacji określám jako 60 %,

obejmował on koordynację projektu, opracowanie metodologii doświadczeń, przeprowadzenie badań eksperymentalnych, analizę i wizualizację danych oraz przygotowanie publikacji naukowej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Strzygi-Lach.

KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII

Alicja Chrzanowska
.....
dr hab. n. med. Alicja Chrzanowska
(podpis oświadczającego)

dr Jarosław Szczepaniak

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **1,3-disubstituted thiourea derivatives: promising candidates for medicinal applications with enhanced cytotoxic effects on cancer cells** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowią:

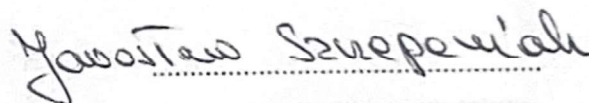
opracowanie metodologii oraz przeprowadzenie badań doświadczalnych dotyczących mikroskopii konfokalnej.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określám jako 5 %.

Wkład Pauliny Strzygi-Lach w powstawanie publikacji określám jako 60 %,

obejmował on koordynację projektu, opracowanie metodologii doświadczeń, przeprowadzenie badań eksperymentalnych, analizę i wizualizację danych oraz przygotowanie publikacji naukowej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Strzygi-Lach.



(podpis oświadczającego)

Dr hab. Anna Bielenica

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **1,3-disubstituted thiourea derivatives: promising candidates for medicinal applications with enhanced cytotoxic effects on cancer cells** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowią:

formułowanie koncepcji badawczej, weryfikacja wyników badań oraz nadzór naukowy.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określłam jako 5 %.

Wkład Pauliny Strzygi-Łach w powstawanie publikacji określłam jako 60 %,

obejmował on koordynację projektu, opracowanie metodologii doświadczeń, przeprowadzenie badań eksperymentalnych, analizę i wizualizację danych oraz przygotowanie publikacji naukowej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Strzygi-Łach.

.....*Anna Bielenica*.....

(podpis oświadczającego)

mgr Paulina Strzyga-Łach

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Proapoptotic effects of halogenated bis-phenylthiourea derivatives in cancer cells** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowią:

opracowanie metodologii badawczej, realizacja eksperymentów, analiza oraz interpretacja wyników badań, przygotowanie publikacji naukowej, opracowanie wizualizacji danych, a także obsługa administracyjna związana z projektem.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określám jako 60 %.

Paulina Strzyga-Łach

(podpis oświadczającego)

dr hab. Alicja Chrzanowska

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Proapoptotic effects of halogenated bis-phenylthiourea derivatives in cancer cells** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowią:

opracowanie metodologii badawczej, interpretację wyników badań oraz przygotowanie publikacji naukowej.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 10 %.

Wkład Pauliny Strzygi-Lach w powstawanie publikacji określam jako 60 %,

obejmował on opracowanie metodologii badawczej, realizację eksperymentów, analizę oraz interpretację wyników badań, przygotowanie publikacji naukowej, opracowanie wizualizacji danych, a także obsługę administracyjną związaną z projektem.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Strzygi-Lach.

KATEDRA / ZAKŁAD BIOCHEMII
Alicja Chrzanowska
(podpis oświadczającego)
dr hab. n. med. Alicja Chrzanowska

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Proapoptotic effects of halogenated bis-phenylthiourea derivatives in cancer cells** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowią:

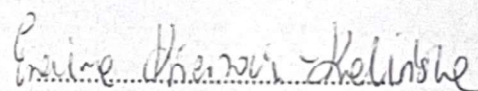
cytometryczna ocena procesu apoptozy oraz przygotowanie danych do dalszej analizy.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określłam jako 5 %.

Wkład Pauliny Strzygi-Łach w powstawanie publikacji określłam jako 60 %,

obejmował on opracowanie metodologii badawczej, realizację eksperymentów, analizę oraz interpretację wyników badań, przygotowanie publikacji naukowej, opracowanie wizualizacji danych, a także obsługę administracyjną związaną z projektem.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Strzygi-Łach.



(podpis oświadczającego)

dr Barbara Żyżyńska-Granica

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Proapoptotic effects of halogenated bis-phenylthiourea derivatives in cancer cells** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowią:

cytometryczna ocena cyklu komórkowego oraz przygotowanie danych do dalszej analizy.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określám jako 5 %.

Wkład Pauliny Strzygi-Łach w powstawanie publikacji określám jako 60 %,

obejmował on opracowanie metodologii badawczej, realizację eksperymentów, analizę oraz interpretację wyników badań, przygotowanie publikacji naukowej, opracowanie wizualizacji danych, a także obsługę administracyjną związaną z projektem.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Strzygi-Łach.



(podpis oświadczającego)

mgr Katarzyna Podsadni

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Proapoptotic effects of halogenated bis-phenylthiourea derivatives in cancer cells** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowią:

oczyszczenie zsyntetyzowanych związków i przygotowanie ich do badań biologicznych.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określłam jako 5 %.

Wkład Pauliny Strzygi-Lach w powstawanie publikacji określłam jako 60 %,

obejmował on opracowanie metodologii badawczej, realizację eksperymentów, analizę oraz interpretację wyników badań, przygotowanie publikacji naukowej, opracowanie wizualizacji danych, a także obsługę administracyjną związaną z projektem.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Strzygi-Lach.

Katarzyna Podsadni
.....
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 23.05.2025

mgr Piotr Podsadni

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Proapoptotic effects of halogenated bis-phenylthiourea derivatives in cancer cells** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

oznaczenie czystości związków metodą HPLC.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określám jako 5 %.

Wkład Pauliny Strzygi-Łach w powstawanie publikacji określám jako 60 %,

obejmował on opracowanie metodologii badawczej, realizację eksperymentów, analizę oraz interpretację wyników badań, przygotowanie publikacji naukowej, opracowanie wizualizacji danych, a także obsługę administracyjną związaną z projektem.

Jednocześnie wyrażám zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Strzygi-Łach.



(podpis oświadczającego)

Dr hab. Anna Bielenica

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Proapoptotic effects of halogenated bis-phenylthiourea derivatives in cancer cells** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowią:

formułowanie koncepcji badawczej, synteza związków chemicznych, interpretacja wyników badań oraz udział w pisaniu publikacji.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określłam jako 10 %.

Wkład Pauliny Strzygi-Łach w powstawanie publikacji określłam jako 60 %,

obejmował on opracowanie metodologii badawczej, realizację eksperymentów, analizę oraz interpretację wyników badań, przygotowanie publikacji naukowej, opracowanie wizualizacji danych, a także obsługę administracyjną związaną z projektem.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Strzygi-Łach.

.....*Anna Bielenica*.....

(podpis oświadczającego)